

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LARISSA COMARELLA

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE MUTANTES DA PROTEÍNA NifA DE
*Herbaspirillum seropedicae***

**CURITIBA
2008**

LARISSA COMARELLA

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE MUTANTES DA PROTEÍNA NifA DE
*Herbaspirillum seropedicae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências (Bioquímica) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientadoras: Prof^a. Dr^a M. Berenice R. Steffens
Prof^a. Dr^a Cynthia M.T.F. Picheth

**CURITIBA
2008**

“A todos que agüentaram, agüentam e agüentarão
os fazedores de tese”.

AGRADECIMENTOS

“Toda dissertação tem uma história. Esta história é construída a partir de mil definições do objeto, das mudanças de perspectivas, das indecisões, dos cenários novos, das inseguranças sobre tudo que não foi lido, da paranóia sobre a “qualidade” do escrito, das vontades de rasgar tudo e recomeçar, dos ataques de inspiração e da falta dela. Uma tese exige, além de conhecimentos gerais e específicos, uma enorme paciência e disponibilidade psicológica para expor-se, errar, experimentar, recomeçar, observar e ousar”.

Agradeço à Coordenação do Curso de Pós-Graduação de Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade e formação de qualidade. Agradeço ao CNPq, CAPES, FUNPAR e PRONEX pelo suporte financeiro.

À minha orientadora, Prof. Dra. Maria Berenice Reynaud Steffens por me receber de braços abertos, pela confiança creditada, ensinamentos e conversas fundamentais para a realização desta dissertação.

À Prof. Dra. Cynthia Maria Telles Fadel-Picheth, com carinho muito especial, pois foi quem despertou em mim o interesse pela pesquisa científica. Agradeço pela amizade, confiança, ensinamentos e conselhos. Eu devo muito a você.

À Prof. Dra. Rose Adele Monteiro, pela amizade, companheirismo e toda ajuda e conselhos oferecidos no decorrer deste projeto. Ao Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza pelo apoio, discussões e sugestões aos meus experimentos e aos demais professores do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio da UFPR.

À Dona Julieta, Roseli Prado e ao Valter pela grande amizade e eficiência nos trabalhos a eles requisitados.

A todos os colegas do mestrado, com carinho especial: Lúcia, Viviane, Fernandinha S., Fernanda P., Larissa T, Michelle T., Márcia, João, Marco Antônio, Danilo, Rafael e Glaucio. Aos colegas do complexo 275-279 agradeço pela amizade, risadas e momentos de descontração: Ana C., Gustavo, Jú Inaba, André, Giovana, Jú Osaki, Alexandre, Michelle T. À Lililan N. agradeço pelas informações, discussões, pelos mutantes e plasmídeos cedidos e pelos momentos de descontração. Ao Rafael agradeço o trabalho e plasmídeos cedidos. À todos os colegas do departamento pelos momentos de alegria compartilhados.

Aos meninos Marco Antônio e Marco Aurélio pelo apoio, incentivo, ensinamentos, risadas, piadas, momentos de alegria e dificuldades compartilhados. Vocês são especiais.

Aos meus pais, meus irmãos e ao meu tio Augusto pelo companheirismo, apoio, incentivo e por entenderem os meus sonhos e objetivos. Aos meus amigos pelos momentos de alegria compartilhados, a Vane e ao Du, obrigada pela ajuda, paciência, compreensão e amizade.

À Deus, agradeço.

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria diazotrófica encontrada em associação com plantas de grande importância econômica como cana-de-açúcar, arroz, milho e sorgo. NifA é uma proteína regulatória responsável pela ativação da transcrição dos genes *nif* que codificam para o complexo enzimático nitrogenase, o qual converte o nitrogênio atmosférico em amônio. Esta proteína possui três domínios funcionais e a sua atividade é regulada negativamente pelos níveis de oxigênio e amônio. A regulação por oxigênio está relacionada a um grupo de resíduos de cisteínas localizado entre os domínios Central e C-terminal. Por outro lado, o domínio N-terminal está envolvido no controle da atividade pelos níveis de amônio e interação com uma proteína PII (GlnK ou GlnB), cuja presença é essencial para atividade de NifA. A remoção do domínio N-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae* elimina a regulação por amônio e o requerimento de PII. Entretanto, a regulação por amônio é recuperada quando o domínio N-terminal é co-expresso com a forma N-truncada de NifA (Δ N-NifA) em *E. coli*. O domínio N-terminal contendo as substituições Y18F ou L52Q não possui efeito inibitório sobre NifA N-truncada quando expressas em *E. coli* na presença de altos níveis de amônio. Além disto, uma forma contendo quatro mutações (I96V, E134V, V138E, R157H) também perdeu a capacidade de inibir Δ N-NifA, sugerindo que esses aminoácidos desempenham um papel importante na resposta aos níveis de amônio. Neste trabalho foram construídos genes codificando para proteínas NifA com mutações no seu domínio N-terminal e foi determinado o efeito destas mutações na atividade da proteína NifA em *H. seropedicae*. Os resultados obtidos mostram que as proteínas mutantes NifA-Y18F e NifA-I96V, E134V, V138E (triplo mutante), são parcialmente ativas, enquanto que NifA-L14P/Y18F (duplo mutante), NifA-L52Q, NifA-R157H, NifA-I96V, E134V, V138E, R157H (tetra mutante) são inativas em todas as condições testadas. O mutante NifA-I96V apresentou atividade semelhante a observado para a proteína NifA selvagem. Nenhuma das variantes eliminou o controle da atividade de NifA por amônio ou pela presença de PII. Apesar do domínio N-terminal da proteína NifA ser pouco conservado quando comparado com diferentes organismos, os resultados apresentados neste trabalho sugerem que alguns aminoácidos (Tyr-18, Leu-52 e Arg-157) presentes neste domínio, são importantes para a atividade de NifA.

Palavras-chave: *Herbaspirillum seropedicae*, variantes da proteína NifA.

ABSTRACT

Herbaspirillum seropedicae is an endophytic diazotroph found in association with roots, stems and leaves of several plants, including economically important gramineous species such as sugarcane, rice, maize and sorghum. NifA is a regulatory protein responsible for activation of *nif* genes whose products catalyse the reduction of atmospheric dinitrogen to ammonium. The NifA protein has three domains and its activity is negatively regulated by oxygen and fixed nitrogen. The oxygen regulation probably involves a conserved cysteine motif located in linker between the central and C-terminal domains. The N-terminal domain, on the other hand, is required for ammonium regulation and interaction with PII proteins (GlnK or GlnB). The removal of the N-terminal domain of NifA abolishes ammonium regulation and the requirement for a PII protein. However when a N-truncated NifA (Δ N-NifA) protein is co-expressed with the N-terminal domain the ammonium regulation is recovered. The N-terminal domain mutant forms containing the substitutions Y18F or L52Q or a tetra mutation (I96V, E134V, V138E, R157H) did not show an inhibitory effect on the N-truncated NifA in the presence of high ammonium levels in *E. coli*, suggesting that these aminoacid residues are important for ammonium control of NifA activity. In this work mutant forms of the *nifA* gene of *H. seropedicae* were obtained which code for NifA proteins containing mutations in its N-terminal domain and determined the effects of these mutations on NifA protein activity in *H. seropedicae*. The results showed that the NifA-Y18F and NifA-I96V, E134V, V138E mutants had partial activities, while the NifA-L14P/Y18F, NifA-L52Q, NifA-R157H and NifA-I96V, E134V, V138E, R157H mutants were inactive under all conditions tested. In contrast, the NifA-I96V mutant showed behavior similar to wild type NifA protein. None of the active NifA variants escaped the ammonium control or the requirement for a PII protein. Despite NifA N-terminal domain to be less conserved when compared with different organisms, the results presented in this work suggest that the aminoacids residues (Tyr-18, Leu-52 e Arg-157) are important for NifA activity.

Key-words: *Herbaspirillum seropedicae*, NifA protein variants.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	SENSOREAMENTO E CONTROLE DO NÍVEL DE NITROGÊNIO INTRACELULAR EM <i>E. coli</i>	23
FIGURA 2 -	ATIVAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO E ESTRUTURA MODULAR DAS “ENHANCER-BINDING PROTEIN”	26
FIGURA 3 -	REGULAÇÃO DOS SISTEMAS NIFL-NIFA DE <i>A. vinelandii</i> E <i>K. pneumoniae</i> EM RESPOSTA AOS NÍVEIS DE NITROGÊNIO.....	28
FIGURA 4 -	ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>nif</i> NO GENOMA DE <i>H. seropedicae</i>	33
FIGURA 5 -	MODELO DE REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES <i>nif</i> EM <i>H. seropedicae</i>	35
FIGURA 6 -	ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DA REGIÃO PROMOTORA DE NIFA DE <i>H. seropedicae</i>	37
FIGURA 7 -	ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ESTRUTURA DA PROTEÍNA NIFA DE <i>H. seropedicae</i>	38
FIGURA 8 -	ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DA SÉRIE pETLAC-cis.....	56
FIGURA 9 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PCR MUTAGÊNICA UTILIZANDO “PRIMERS” COMPLEMENTARES.....	59
FIGURA 10 -	ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DA SÉRIE pETLAC.....	61
FIGURA 11 -	ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DA SÉRIE pLAC E pDKLAC.....	62
FIGURA 12 -	ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DA SÉRIE pMPLAC.....	63
FIGURA 13 -	PADRÃO DE BANDAS OBTIDAS APÓS RESTRIÇÃO DOS CLONES DA SÉRIE pETLAC-cis COM <i>EcoRI</i>	75
FIGURA 14 -	PRODUTOS DAS TRÊS AMPLIFICAÇÕES POR PCR PARA MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA.....	78
FIGURA 15 -	PADRÃO DE BANDAS OBTIDAS APÓS RESTRIÇÃO DOS CLONES DA SÉRIE pETLAC.....	79

FIGURA 16-	ELETROFORETOGRAMAS DA REGIÃO MUTAGENIZADA DO GENE <i>nifA</i>	80
FIGURA 17-	PADRÃO DE BANDAS OBTIDAS APÓS RESTRIÇÃO DOS CLONES DA SÉRIE pLAC.....	84
FIGURA 18-	PADRÃO DE BANDAS OBTIDAS APÓS RESTRIÇÃO DOS CLONES DA SÉRIE pDKLAC.....	85
FIGURA 19-	EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS NifA MUTANTES DA SÉRIE pETLAC.....	87
FIGURA 20-	EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS NifA MUTANTES DA SÉRIE pETLAC-cis.....	88
FIGURA 21-	EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS NifA MUTANTES DA SÉRIE pDKLAC.....	89
FIGURA 22-	EFEITO DAS PROTEÍNAS NifA SELVAGEM, N-TRUNCADAS E MUTANTES EXPRESSAS A PARTIR DO PROMOTOR <i>lac</i> NA COMPLEMENTAÇÃO DE <i>H. seropedicae</i> SmR54 (Nif ⁻).....	94
FIGURA 23-	EFEITO DAS PROTEÍNAS NifA SELVAGEM, N-TRUNCADAS E MUTANTES EXPRESSAS A PARTIR DO PROMOTOR <i>lac</i> NA COMPLEMENTAÇÃO DE <i>A. brasilense</i> FP10 (Nif ⁻).....	96
FIGURA 24 -	ENSAIO DE IMUNODETECÇÃO DAS PROTEÍNAS NifA DE <i>H. seropedicae</i> (SÉRIE pLAC) EM <i>E. coli</i>	98
FIGURA 25 -	EFEITO DAS PROTEÍNAS NifA SELVAGEM, N-TRUNCADA E MUTANTES EXPRESSAS A PARTIR DO PROMOTOR <i>tac</i> NA COMPLEMENTAÇÃO DE <i>H. seropedicae</i> SmR54 (Nif ⁻).....	100
FIGURA 26 -	EFEITO DAS PROTEÍNAS NifA SELVAGEM, N-TRUNCADA E MUTANTES EXPRESSAS A PARTIR DO PROMOTOR <i>tac</i> NA COMPLEMENTAÇÃO DE <i>A. brasilense</i> FP10 (Nif ⁻).....	101
FIGURA 27-	EFEITO DAS PROTEÍNAS NifA SELVAGEM, N-TRUNCADAS E MUTANTES EXPRESSAS A PARTIR DO PROMOTOR <i>lac</i> NA COMPLEMENTAÇÃO DE <i>H. seropedicae</i> LNGlnKDel (Nif ⁻).	104
FIGURA 28-	COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO DOMÍNIO N-TERMINAL DAS PROTEÍNAS NIFA DE DIFERENTES ORGANISMOS.....	108
FIGURA 29-	ESTRUTURA DOS AMINOÁCIDOS TROCADOS NO DOMÍNIO N-TERMINAL DE NifA DE <i>H. seropedicae</i>	110

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	BACTÉRIAS	43
TABELA 2 -	PLASMÍDEOS.....	44
TABELA 3 -	ANTIBIÓTICOS.....	50
TABELA 4 -	OLIGONUCLEOTÍDEOS EMPREGADOS PARA MUTAGENIZAR O DOMÍNIO N-TERMINAL DA PROTEÍNA NIFA DE <i>H. seropedicae</i>	58
TABELA 5 -	OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO	64
TABELA 6 -	SOLUÇÕES E VOLUMES PARA O PREPARO DOS GÉIS DE CORRIDA E EMPILHAMENTO NAS CONCENTRAÇÕES DESCRITAS	66
TABELA 7 -	TAMPÕES DE TRANSFERÊNCIA	68
TABELA 8 -	ANTICORPOS PRIMÁRIOS E BLOQUEADORES	69
TABELA 9 -	CÓDONS ALTERADOS PARA OS ESTUDOS DE MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA	76
TABELA 10 -	DETECÇÃO DA CAPACIDADE DE ATIVAÇÃO TRANSCRICIONAL DAS PROTEÍNAS NIFA MUTAGENIZADAS EM <i>E. coli</i>	92
TABELA 11 -	DETECÇÃO DA CAPACIDADE DE ATIVAÇÃO TRANSCRICIONAL DAS PROTEÍNAS NIFA MUTAGENIZADAS EM <i>H. seropedicae</i> IM40 (<i>nifH::lacZ</i> , <i>nifA</i> ⁺).....	106

LISTA DE ABREVIATURAS

A = Absorbância
 AAA⁺ = ATPases associadas com várias atividades celulares
 ADP = Adenosina difosfato
 AIA = Ácido indolacético
 AMP = Adenosina monofosfato
 Amp^R = Resistência à ampicilina
 ATase = Enzima adenililtransferase
 ATP = Adenosina trifosfato
 Cm^R = Resistência à cloranfenicol
 DNA = Ácido desoxirribonucleico
 dNTPs = 5'trifosfato de 2'desoxinucleotídeos
 DTT = 1,4-dithiothreitol
 DO = Densidade óptica
 e⁻ = Elétron
 EBP = Proteína que se liga a um enhancer
 EDTA = ácido etilenodiamino-tetra ético
 FAD = Flavina Adenina Dinucleotídeo
 g = grama
 GAF = cGMP-specific and stimulated phosphodiesterases, *Anabaena* adenylate cyclases and *Escherichia coli* EhIA
 GDH = glutamato desidrogenase
 GOGAT = glutamato sintase
 GS = glutamina sintetase
 IHF = Fator de integração do hospedeiro
 IPTG = β-isopropil-tiogalactopiranosídeo
 Kb = Quilo base
 kDa = Quilo Daltons
 KΩ = Quilo ohms
 Km^R = resistência a canamicina
 L = litro
 m/v = Massa volume
 mL = mililitro
 N₂ase = Nitrogenase
 NAD⁺ = Nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado
 NADPH = Fosfato nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido

Nal^R = Resistência ao ácido nalidixico

NH₃ = Amônia

NH₄⁺ = Íons amônio

nm = Comprimento de onda em nanometro

ONPG = o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo

pb = Pares de base

PCR = Reação em cadeia da polimerase

Pi = Fosfato inorgânico

pmol = Pico mol

PVDF = Fluoreto de polivilideno

RBS = Sítio de ligação de ribossomo

RNA = Ácido ribonucléico

rpm = Rotação por minuto

SDS = Dodecilsulfato de sódio

Sm^R = Resistência à estreptomicina

Tc^R = Resistência à tetraciclina

TRIS = Tris(hidroximetil)-aminometano

UAS = Sequência regulatória a montante

UMP = Uridina monofosfato

UTase = enzima uridililtransferase

UTP = Uridina trifosfato

X-gal = 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactopiranosídeo

2OG = 2-oxoglutarato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO – FBN.....	13
1.1.1	Importância da FBN na agricultura.....	14
1.2	COMPLEXO ENZIMÁTICO NITROGENASE.....	15
1.3	TRANSPORTE DE AMÔNIO.....	17
1.4	ASSIMILAÇÃO DO NITROGÊNIO.....	18
1.5	SISTEMA Ntr.....	19
1.6	PROTEÍNA NIFA.....	24
1.6.1	Controle da atividade de NifA em diferentes organismos.....	27
1.7	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	31
1.7.1	Organização e regulação dos genes <i>nif</i> de <i>H. seropedicae</i>	32
1.7.2	Controle da expressão de <i>nifA</i> em <i>H. seropedicae</i>	36
1.7.3	Controle da atividade da proteína NifA em <i>H. seropedicae</i>	37
2	OBJETIVOS.....	42
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1	BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS.....	43
3.2	MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	47
3.2.1	Estocagem.....	50
3.2.2	Antibióticos.....	50
3.3	PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL.....	51
3.4	DIGESTÃO DO DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.....	51
3.5	LIGAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA AOS VETORES.....	52
3.6	ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE DNA.....	52
3.6.1	Purificação de DNA através de eletroforese em gel de Agarose de Baixo Ponto de Fusão.....	52
3.7	TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO.....	53
3.7.1	Preparo de células de <i>E. coli</i> eletrocompetentes.....	53
3.7.2	Eletroporação.....	53
3.8	CONJUGAÇÃO.....	54
3.9	LIGAÇÃO DO DOMÍNIO N-TERMINAL MUTAGENIZADO COM O DOMÍNIO CENTRAL+C-TERMINAL DA PROTEÍNA NIFA DE <i>H. seropedicae</i>	54
3.9.1	Restrição dos plasmídeos pETLETY18F, pETLETL52Q, pETLET4.2 (tetra mutante) e pRAM1 e construção dos plasmídeos da série pETLAC-cis.....	54
3.10	MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA DA REGIÃO N-TERMINAL DA PROTEÍNA NifA.....	57
3.11	CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DA SÉRIE pETLAC.....	60
3.12	CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DAS SÉRIES pLAC e pDKLAC..	61
3.13	CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DA SÉRIE pMPLAC.....	63
3.14	SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	63
3.14.1	Reação de sequenciamento.....	65
3.15	ELETROFORESE DE PROTEÍNAS (SDS-PAGE).....	66
3.16	EXPRESSÃO DAS FORMAS SELVAGEM E MUTAGENIZADAS DA PROTEÍNA NIFA DE <i>H. seropedicae</i> A PARTIR DOS PROMOTORES pT7 e ptac.....	67

3.17	IMUNODETECÇÃO DAS FORMAS SELVAGEM E MUTAGENIZADAS DA PROTEÍNA NIFA DE <i>H. seropedicae</i> A PARTIR DO PROMOTOR <i>p_{lac}</i>	67
3.17.1	Transferência.....	68
3.17.2	Tratamento da membrana.....	69
3.18	DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	70
3.19	ANÁLISE FISIOLÓGICA DAS FORMAS MUTAGENIZADAS DA PROTEÍNA NIFA DE <i>H. seropedicae</i>	70
3.19.1	Capacidade de ativação da transcrição dos genes <i>nifH</i> e <i>nifB</i> “in vivo”.	70
3.19.1.1	Determinação da atividade de β -galactosidase em <i>E. coli</i>	71
3.19.1.2	Determinação da atividade de β -galactosidase em <i>H. seropedicae</i>	72
3.19.2	Determinação da atividade de nitrogenase.....	72
4	RESULTADOS	74
4.1	OBTENÇÃO DAS FORMAS VARIANTES DE NIFA DE <i>H. seropedicae</i>	74
4.1.1	Ligação do domínio N-terminal mutagenizado com o domínio Central+C-terminal da proteína NifA de <i>H. Seropedicae</i>	74
4.1.2	Mutagênese sítio-dirigida.....	76
4.2	SEQUENCIAMENTO.....	80
4.3	LIGAÇÃO DOS FRAGMENTOS MUTAGENIZADOS NO VETOR <i>pLAFR3.18</i>	83
4.4	LIGAÇÃO DOS FRAGMENTOS MUTAGENIZADOS NO VETOR <i>pDK7</i> E CO-INTEGRAÇÃO COM <i>pMP220</i>	83
4.5	EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS NIFA SELVAGEM E MUTANTES.....	86
4.5.1	Expressão das proteínas NifA mutagenizadas a partir do promotor <i>T7</i>	86
4.5.2	Expressão das proteínas NifA mutagenizadas a partir do promotor <i>tac</i>	88
4.6	ANÁLISE FISIOLÓGICA DAS PROTEÍNAS NIFA MUTAGENIZADAS.	90
4.6.1	Capacidade de ativação transcricional das proteínas NifA mutantes em <i>E. coli</i>	90
4.6.2	Atividade de Nitrogenase.....	91
4.6.2.1	Complementação da estirpe mutante SmR54 de <i>H. seropedicae</i>	93
4.6.2.2	Complementação da estirpe mutante FP10 de <i>A. brasilense</i>	95
4.6.2.3	Complementação das estirpes mutantes SmR54 de <i>H. seropedicae</i> e FP10 de <i>A. brasilense</i> com os plasmídeos da série <i>pMPLAC</i>	99
4.6.2.4	Complementação da estirpe mutante LNGlnKDel de <i>H. seropedicae</i>	102
4.6.2.5	Capacidade de ativação transcricional das proteínas NifA mutantes em <i>H. seropedicae</i>	105
4.7	ANÁLISE DAS TROCAS DE RESÍDUOS EFETUADAS NO DOMÍNIO N-TERMINAL DE NIFA DE <i>H. seropedicae</i>	107
4.7.1	Análise da região da proteína NifA onde foram efetuadas as trocas de aminoácidos.....	107
4.7.2	Análise da estrutura dos aminoácidos trocados e da estrutura secundária da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i>	109
5	DISCUSSÃO	114
6	CONCLUSÕES	119
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
	ANEXOS	131

1. INTRODUÇÃO

1.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO – FBN

O nitrogênio é um elemento essencial à vida, necessário para a produção de aminoácidos, nucleotídeos, açúcares aminados, entre outras moléculas. A atmosfera terrestre é composta por aproximadamente 78% de gás dinitrogênio, entretanto, a assimilação pela maioria dos seres vivos requer a sua transformação para uma forma combinada (DIXON & KAHN, 2004, REES *et al*, 2005). Apenas alguns procariotos conseguem converter o nitrogênio atmosférico (N₂) em amônia ou nitrato, que pode ser utilizada pela maioria dos organismos. O processo de incorporação de nitrogênio é chamado de fixação biológica do nitrogênio (FBN) e os organismos capazes de realizá-lo são denominados diazotrofos (PEOPLES & CRASWELL, 1992; REES *et al*, 2005).

Já foram descritas espécies representantes de vários grupos de procariotos que fixam nitrogênio, tais como: bactérias fotossintéticas (ex: *Rhodospirillum rubrum*), bactérias anaeróbicas (ex: *Clostridium* spp.), microaeróbicas (ex: *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp., *Gluconoacetobacter diazotrophicus*, *Azorhizobium caulinodans*, *Azoarcus* spp., *Burkholderia* spp., etc.), bactérias aeróbicas (ex: *Azotobacter* spp. e *Derxia* spp.) e também alguns representantes das cianobactérias e actinomicetos (DIXON & KAHN, 2004). Estes organismos ocupam uma grande variedade de habitats, podendo ser classificados em três grupos de acordo com a sua forma de vida: diazotrofos de vida livre, que fixam o nitrogênio para seu próprio uso; diazotrofos associativos, que se desenvolvem associados às plantas e contribuem para o crescimento destas sem formar estruturas diferenciadas e os diazotrofos simbióticos, que estabelecem uma interação muito estreita entre o macro e microsimbionte e formam estruturas diferenciadas, que no caso de rizóbios são denominadas nódulos (DOBEREINER, 1992b; FISHER, 1994; BALDANI *et al*, 1997a).

Entre os diazotrofos associativos existem dois grupos: os endofíticos facultativos, que podem colonizar tanto a rizosfera quanto o interior das raízes e os endofíticos obrigatórios que colonizam o interior das raízes, caules e folhas (DOBEREINER, 1992b). Entre os endofíticos facultativos estão as espécies de *Azospirillum*, enquanto o grupo de endofíticos obrigatórios compreende as espécies

G. diazotrophicus, *Azoarcus* spp., *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *Burkholderia* sp. (DOBEREINER, 1992b; BALDANI *et al.*, 1997).

Os diazotrofos endofíticos usualmente não causam danos às plantas, pelo contrário, exercem seus efeitos positivos no crescimento destas direta ou indiretamente através de uma combinação de diferentes mecanismos (BALDANI *et al.*, 1997; DOBBELAERE, VANDERLEYDEN & OKON, 2003). Além da fixação de nitrogênio, podem afetar diretamente o crescimento da planta pela síntese de fitohormônios e vitaminas, melhora na captação de nutrientes, ativação de resistência a estresses, solubilização de fosfato inorgânico e mineralização de fosfato orgânico. Indiretamente, os diazotrofos são capazes de diminuir ou prevenir os efeitos deletérios causados por microrganismos patogênicos, geralmente através da síntese de antibióticos e/ou compostos fungicidas, através da competição por nutrientes ou por indução de sistemas de resistência a patógenos (BASHAN & HOLGUIN, 1997; DOBBELAERE, VANDERLEYDEN & OKON, 2003). A habilidade de sintetizar fitohormônios é amplamente distribuída entre bactérias associadas com plantas. As auxinas estão entre as substâncias de crescimento vegetal produzidas por algumas bactérias diazotróficas, das quais o ácido indolacético (AIA), que estimula tanto a elongação quanto a divisão e diferenciação celular nas plantas, é a substância mais ativa e melhor caracterizada (BANDULZKI & SHULZE, 1977; CROZIER *et al.*, 1988).

1.1.1 Importância da FBN na agricultura

A introdução do nitrogênio atmosférico via FBN nos ciclos biogeoquímicos do nitrogênio tem efeitos positivos no ambiente e na economia, uma vez que, a utilização de grandes quantidades de fertilizantes gera problemas aos agroecossistemas (DIXON & KAHN, 2004). Os fertilizantes têm um papel importante na agricultura moderna, representando a maior interferência humana no ciclo do nitrogênio. Entretanto, as adubações nitrogenadas provocam danos ao ambiente como a emissão de óxidos de nitrogênio, acidificação do solo pela presença de altos níveis de NO_2^- e NO_3^- , além de alterações no desenvolvimento das plantas pelo excesso de nitrogênio e eutrofização da água (PEOPLES & CRASWELL, 1992; GRAHAM & VANCE, 2000; DIXON & KAHN, 2004).

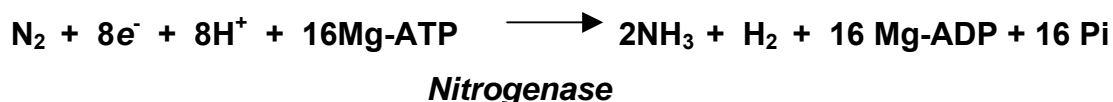
No Brasil, os produtores costumam ter grandes gastos com fertilizantes nitrogenados todos os anos e estes custos econômicos e ambientais relacionados à fertilização nitrogenada, têm estimulado a busca por alternativas que possam diminuir a utilização destes compostos, sem que haja diminuição da produção. Uma das possibilidades é a inoculação de bactérias diazotróficas que podem associar-se as plantas para fixar nitrogênio atmosférico e/ou produzir substâncias promotoras de crescimento de plantas (DOBBELAERE, VANDERLEYDEN & OKON, 2003). Contudo, esse potencial de fixação depende do genótipo da planta, que permitirá a interação planta-bactéria, das condições ambientais, da região de produção e da competitividade com os demais microrganismos do local (BODDEY *et al.*, 1991; GRAHAM & VANCE, 2000). A introdução do nitrogênio atmosférico através da FBN é menos propensa a lixiviação e volatilização, além de garantir um ecossistema em equilíbrio, pois a redução da aplicação de doses excessivas de compostos nitrogenados como, por exemplo, o nitrato, que contamina as águas e os vegetais consumidos pelo homem, possibilita o desenvolvimento de uma agricultura menos agressiva, gerando efeitos positivos e importantes para o ambiente, agricultura e economia (PEOPLES & CRASWELL, 1992; DIXON & KAHN, 2004).

1.2 COMPLEXO ENZIMÁTICO NITROGENASE

Embora a maioria das bactérias assimile nitrogênio na forma de amônio para o uso em vias biossintéticas, um número limitado de bactérias é capaz de converter o dinitrogênio atmosférico em NH_4^+ (HALBLEIB & LUDDEN, 2000). O complexo enzimático nitrogenase, produto dos genes *nif*, é responsável por catalisar a redução de N_2 a amônia (MERRICK, 1992; KIM & REES, 1994) e devido a sua sensibilidade ao oxigênio e ao alto custo energético do processo de fixação de nitrogênio, essa atividade em diazotrofos é estritamente regulada (POSTAGATE, 1998).

O complexo da nitrogenase consiste de duas metalo-proteínas, a proteína ferro (Fe) ou dinitrogenase redutase e a proteína ferro-molibidênio (FeMo) ou dinitrogenase (HOWARD & REES, 1996). A proteína Fe é um dímero constituído de duas subunidades γ idênticas codificadas pelo gene *nifH* e ligadas por um centro 4Fe-4S. A proteína FeMo é um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$, sendo que a subunidade α é codificada pelo gene *nifD* e a β pelo gene *nifK* (KIM & REES, 1994; HOWARD &

REES, 1996). A redução do substrato pela nitrogenase requer a redução da proteína Fe por transportadores de elétrons, a transferência de elétrons para a proteína FeMo através de um processo dependente da hidrólise de Mg-ATP (no mínimo 2 Mg-ATP/por elétrons transferidos) e a transferência de elétrons para o substrato ligado ao sítio ativo da proteína FeMo. Em condições ótimas, a estequiometria global da reação é a seguinte (SIMPSON & BURRIS, 1984; REES *et al.*, 2005):



A estequiometria mínima de dois MgATP hidrolisados por elétron que é transferido em cada passo no ciclo catalítico da nitrogenase, representa uma demanda considerável de energia (DIXON e KAHN, 2004). Além disso, o crescimento de diazotrofos na ausência de nitrogênio fixado requer altas concentrações da enzima nitrogenase, que chega a atingir 10 a 20% da quantidade de proteína total celular sob condições de fixação de nitrogênio. Assim, a síntese da nitrogenase é estritamente regulada ao nível de transcrição em resposta à disponibilidade de nitrogênio no meio (DIXON e KAHN, 2004).

A nitrogenase também é sensível ao oxigênio e esta sensibilidade impõe consideráveis restrições fisiológicas nos diazotrofos, uma vez que são obrigados a proteger a enzima de danos causados pelo oxigênio. Na maioria dos diazotrofos, diversas estratégias são utilizadas para a proteção da nitrogenase contra o oxigênio, incluindo crescimento anaeróbico, consumo do excesso de oxigênio por respiração e compartimentalização da enzima ou barreiras de difusão do oxigênio, como por exemplo, os nódulos. A dificuldade de conciliar a fixação de nitrogênio com a presença do oxigênio é também refletida no nível de expressão da nitrogenase (DIXON & KAHN, 2004).

Em proteobactérias, a síntese do complexo enzimático nitrogenase depende da atividade da proteína NifA em conjunto com a holoenzima RNA polimerase- σ^{54} , responsável pela ativação da transcrição dos genes *nif* (genes da fixação do nitrogênio), que codificam a nitrogenase e outras proteínas necessárias para a

síntese desta enzima, o transporte de elétrons, regulação da transcrição e maturação dos componentes da nitrogenase (MERRICK, 1992).

1.3 TRANSPORTE DE AMÔNIO

O amônio é uma excelente fonte de nitrogênio para a célula e sua passagem através das membranas biológicas é um importante processo que ocorre em muitos organismos, incluindo bactérias, fungos, algas e plantas superiores (THOMAS, MULLINS & MERRICK, 2000). Quando há altas concentrações de amônio no meio ($> 1 \text{ mmol/L}$), a difusão passiva através da membrana das espécies não carregadas (uma vez que as membranas lipídicas são relativamente impermeáveis a forma catiônica NH_4^+) geralmente é suficiente para promover o crescimento celular em bactérias e fungos. Entretanto, em baixas concentrações, quando a difusão torna limitante a entrada de nitrogênio, um sistema de transporte de amônio é necessário (KLEINER, 1985; ZHENG *et al.*, 2004; LUDEWIG, NEUHÄUSER & DYNOWSKI, 2007). Normalmente, tanto NH_3 quanto NH_4^+ estão presentes em sistemas biológicos e, em pH fisiológico (em torno de 7 ou abaixo), a maior parte das moléculas permanece na forma de íons amônio. Consequentemente, tanto a difusão passiva de NH_3 quanto o transporte específico de NH_4^+ podem estar ocorrendo (VON WIRÈN & MERRICK, 2004).

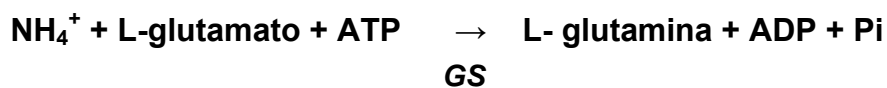
As proteínas transportadoras de amônio (metilamina permeases/transportadores de amônio/ rhesus – Mep/Amt/Rh) estão presentes em todos os domínios da vida (VON WIRÈN & MERRICK, 2004; ZHENG *et al.*, 2004). Os primeiros transportadores de amônio isolados e caracterizados funcionalmente foram os transportadores de alta afinidade Mep1 e Amt1 de *Saccharomyces cerevisiae* e *Arabidopsis thaliana*, respectivamente (MARINI *et al.*, 1994; NINNEMANN *et al.*, 1994). Subseqüentemente muitas outras proteínas transportadoras foram identificadas em plantas, leveduras e bactérias (VON WIRÈN & MERRICK, 2004). Também foi demonstrado que as proteínas do grupo sanguíneo Rh (Rhesus humano), encontradas nos eritrócitos, fígado e rins, exibem significativa similaridade com a seqüência de aminoácidos de transportadores de amônio. Estes transportadores são importantes na detoxificação celular e excreção de íons amônio (MARINI *et al.*,

1997; ZHENG *et al.*, 2004). Atualmente, mais de 200 genes pertencentes a família Mep/Amt/Rh são conhecidos (ZHENG *et al.*, 2004) e além de amônio, as proteínas destas famílias transportam também seu análogo metilamônio (THOMAS, MULLINS & MERRICK, 2000). Dentre os muitos transportadores, a proteína Amt de *E. coli* (AmtB) é freqüentemente utilizada para estudos biológicos destes canais para transporte de amônio (CONROY *et al.*, 2007). Com a determinação da estrutura da proteína AmtB de *E. coli* sugeriu-se que estas proteínas transportadoras de amônio são canais que reconhecem os íons amônio (NH_4^+) como substrato, porém são condutores de amônia (NH_3) (ZHENG *et al.*, 2004).

1.4 ASSIMILAÇÃO DO NITROGÊNIO

Nas células os primeiros produtos resultantes da assimilação da amônio são o glutamato e a glutamina que servem como doadores chave de nitrogênio para as reações biossintéticas (MERRICK & EDWARDS, 1995; REITZER, 2003). Há duas grandes vias que facilitam a incorporação do nitrogênio ao glutamato e glutamina. A via mais importante é a via da glutamina sintetase/glutamato sintase (GS/GOGAT), onde a glutamina sintetase (GS) converte glutamato e amônio a glutamina e a glutamato sintase (GOGAT), transfere o grupo amida da glutamina para o 2-oxoglutarato para produzir duas moléculas de glutamato (MERRICK & EDWARDS, 1995; ARCONDÉGUY, JACK & MERRICK, 2001; REITZER, 2003). A reação total produz glutamato a partir de amônia e 2-oxoglutarato, como mostrado nas reações 1 e 2.

Reação 1:



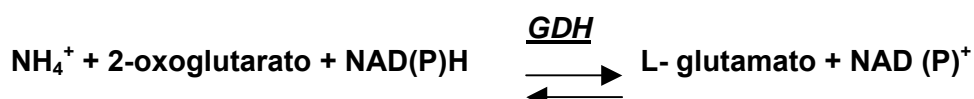
Reação 2:



Em alguns organismos a GS/GOGAT é a única via de assimilação da amônio, entretanto em outras bactérias (incluindo as enterobactérias) uma rota alternativa

para assimilação está presente (MERRICK & EDWARDS, 1995). Esta segunda via é a da Glutamato Desidrogenase (GDH) (reação 3) e funciona quando a concentração de amônio é alta. A GDH catalisa a aminação redutiva do 2-oxoglutarato pelo amônio, resultando na formação de glutamato através de uma reação dependente de NADPH (MERRICK & EDWARDS, 1995).

Reação 3:



1.5 SISTEMA Ntr

Apesar do amônio ser a fonte de nitrogênio preferida para o crescimento bacteriano, outras fontes podem ser utilizadas. O sistema Ntr controla o metabolismo geral do nitrogênio, regulando a utilização do amônio e de fontes alternativas de nitrogênio como nitrato e aminoácidos (MERRICK & EDWARDS, 1995). A regulação da assimilação do nitrogênio é bem estudada em microrganismos da classe γ Proteobacteria como *E. coli*, mas também está presente em α e β Proteobacteria (MERRICK & EDWARDS, 1995; MERRICK, 2004).

Em *E. coli* este sistema foi descrito como composto por sete proteínas: uridililtransferase/enzima removedora de uridilil (UTase/UR ou GlnD) codificada pelo gene *glnD*; as proteínas regulatórias transdutoras de sinal do tipo PII - GlnB codificada pelo gene *glnB* e GlnK codificada pelo gene *glnK* e um sistema regulatório de dois componentes composto por uma proteína histidina quinase NtrB e o regulador de resposta NtrC, codificados respectivamente pelos genes *ntrB* e *ntrC*. Além disso, as proteínas ATase (GlnE) codificada pelo gene *glnE*, a glutamina sintetase (GS ou GlnA) codificada pelo gene *glnA* e mais recentemente a proteína trimérica AmtB, codificada pelo gene *amtB*, também participam da regulação pelo sistemas Ntr e podem ser consideradas integrantes deste sistema (MERRICK & EDWARDS, 1995; REITZER, 2003; JAVELLE & MERRICK, 2005).

A disponibilidade de nitrogênio determina o comportamento das proteínas do sistema Ntr. Limitações em nitrogênio aumentam a atividade específica de GS, a síntese de GS e expressão dos genes *ntr*, enquanto que a suficiência em nitrogênio diminui os três (REITZER, 2003). Muitos fatores determinam o estado de adenililação de GS e três proteínas estão envolvidas. A primeira proteína, a ATase, é uma adenililtransferase que transfere AMP do ATP para um resíduo de tirosina específico na GS e também possui função removedora de AMP (MERRICK & EDWARDS, 1995; LEIGH & DODSWORTH, 2007). A segunda proteína é a proteína alostérica efetora GlnB e que existe em duas formas: não uridililada e uridililada e, tanto GlnB uridililada quanto desuridililada podem interagir com ATase. GlnB na sua forma não uridililada estimula a adenililação de GS pela ATase, enquanto que GlnB uridililada (GlnB-UMP) estimula a desadenililação (MERRICK & EDWARDS, 1995; LEIGH & DODSWORTH, 2007). A terceira proteína, UTase/UR ou GlnD é uma enzima com atividade de uridililtransferase/uridilil removedora, que pode transferir o grupo UMP do UTP para um resíduo particular de tirosina em GlnB e também remover o grupo UMP por hidrólise (BROWN *et al.*, 1971; MERRICK & EDWARDS, 1995; LEIGH & DODSWORTH, 2007).

Além destas três proteínas, 2-oxoglutarato (2OG) e glutamina foram identificados como efetores alostéricos e a relação entre esses dois metabólitos (glutamina/2-oxoglutarato), é indicadora dos níveis de nitrogênio intracelular (MERRICK & EDWARDS, 1995; NINFA & JIANG, 2005). Há muitas proteínas sensoras de 2OG, mas as mais estudadas pertencem a superfamília de proteínas PII (NINFA & JIANG, 2005; LEIGH & DODSWORTH, 2007). Em condições de fixação, 2OG parece induzir uma mudança conformacional em PII para deixá-la em uma conformação ideal para uridililação. Logo, altas concentrações de 2OG levam a inibição da interação de GlnB com seus alvos, como a proteína NtrB (NINFA, *et al.*, 1993). A proteína GlnD é sensora da glutamina, o indicador de suficiência em nitrogênio. Via GlnD, a glutamina diminui o grau de uridililação de GlnB e consequentemente aumenta o nível de adenililação de GS (NINFA & JIANG, 2005; LEIGH & DODSWORTH, 2007). Em contraste com a glutamina, 2OG age diretamente sobre GlnB juntamente com o ATP e ambos os efetores são requeridos em condições micromolares para que GlnB seja funcional (REITZER, 2003; LEIGH & DODSWORTH, 2007). Portanto, concentrações micromolares de 2OG e ATP são requeridas para uridililação ou desuridililação de GlnB, porém é a concentração de

glutamina que vai reprimir ou estimular a uridililação da proteína PII (LEIGH & DODSWORTH, 2007).

Os níveis de nitrogênio celular também afetam a transcrição do gene que codifica GS, *glnA*. Em enterobactérias, *glnA* é componente de um complexo operon *glnAntrBC* no qual *ntrB* e *ntrC* codificam proteínas NtrB e NtrC respectivamente, pertencentes a um sistema de transdução de sinal de dois componentes (MERRICK & EDWARDS, 1995; LEIGH & DODSWORTH, 2007). A NtrB é uma proteína histidina quinase que possui função regulatória positiva e negativa e tem atividade de quinase e fosfatase (MERRICK & EDWARDS, 1995; ARCONDÉGUY, JACK & MERRICK, 2001). NtrB catalisa a fosforilação e defosforilação de NtrC e é estimulada a fosforilar NtrC na presença de GlnB e ATP (MERRICK & EDWARDS, 1995). GlnB desuridililada atua como inibidor da atividade de quinase de NtrB (JIANG & NINFA, 1999). NtrC é uma típica proteína ativadora transcricional dependente do fator σ^{54} . É uma proteína dimérica que possui três domínios, sendo que o N-terminal constitui o domínio receptor com o qual, em baixos níveis de nitrogênio, a proteína sensora NtrB interage para fosforilar um resíduo de aspartato conservado (Asp-54) (ARCONDÉGUY, JACK & MERRICK, 2001). A fosforilação de NtrC é requerida para induzir a oligomerização dos dímeros de NtrC e a ligação as seqüências UAS (Upstream Activator Sequence) ou seqüências ativadoras no DNA, localizadas aproximadamente 100 pb a montante da seqüência promotora (METTKER *et al.*, 1995; MERRICK & EDWARDS, 1995). Os genes que tem transcrição ativada por NtrC fosforilada são: *glnAntrBC*, *glnHQP* (transporte de glutamina), *argT* (transporte de arginina), *nasFEDCBA* (assimilação do nitrato), *nifA* (regulação da transcrição dos genes *nif*) entre outros (MERRICK & EDWARDS, 1995).

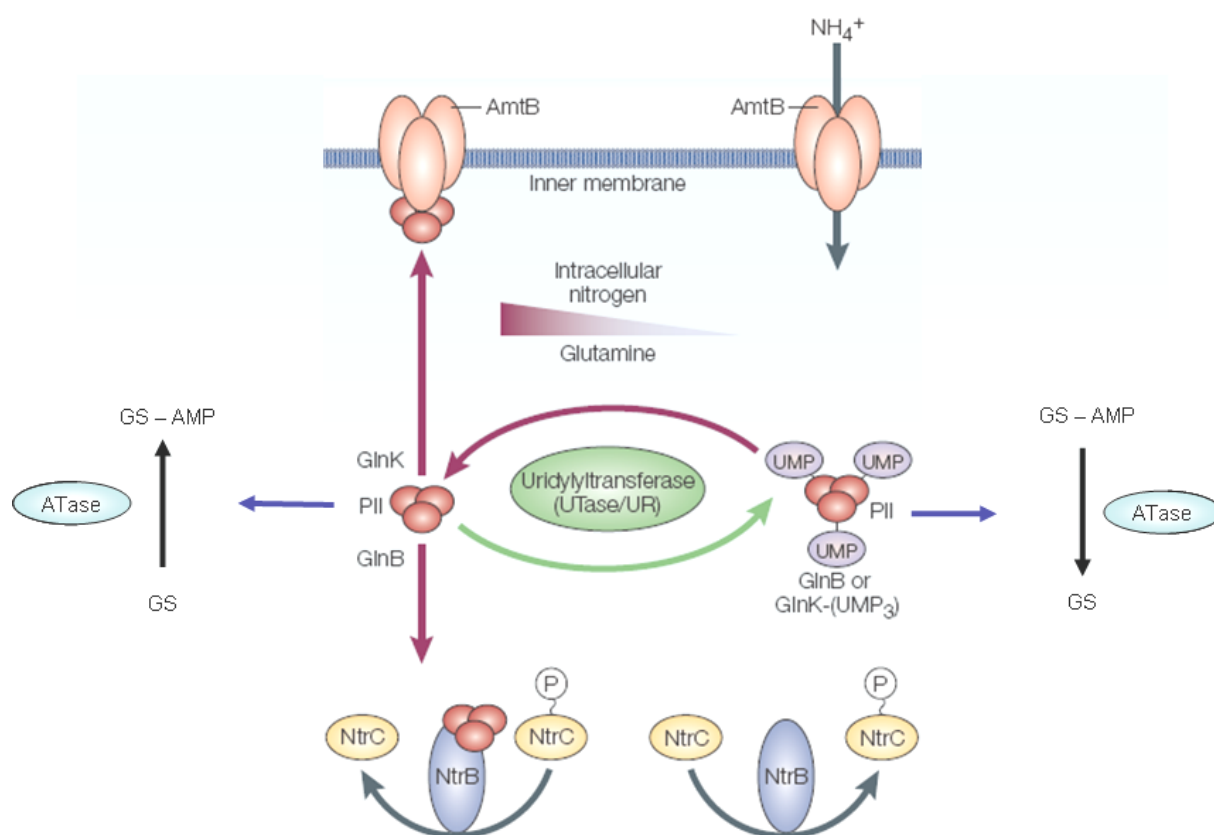
Além das proteínas acima descritas, a proteína do tipo PII – GlnK – também exerce um importante papel na regulação em resposta aos níveis de nitrogênio. Em *E. coli* a proteína GlnK possui 67% de identidade com a proteína GlnB (ATKINSON & NINFA, 1999). Geralmente GlnK é codificada em um operon com o gene *amtB* a jusante (ARCONDÉGUY, JACK & MERRICK, 2001) e é capaz de se ligar a proteína AmtB inibindo a atividade deste transportador (JAVELLE *et al.*, 2004). Recentemente, a estrutura tridimensional do complexo inibitório GlnK-AmtB foi descrita, representando a primeira estrutura do complexo PII-receptor (CONROY *et al.*, 2007).

A figura 1 mostra um modelo esquemático de regulação em resposta aos níveis de nitrogênio em *E. coli*. Em condições limitantes de nitrogênio a proteína GlnD tem sua atividade de uridilil transferase estimulada e catalisa a transferência de um grupamento UMP à proteína GlnB. GlnB-UMP promove a desadenilação de GS pela ATase, que fica na sua forma ativa, responsável pela assimilação da amônia (MERRICK & EDWARDS, 1995). Além disso, a forma uridililada de GlnB não consegue se ligar à proteína NtrB, a qual na forma livre tem atividade de quinase e catalisa a fosforilação da proteína NtrC, ativando-a. NtrC fosforilada (NtrC-P) ativa a transcrição de genes envolvidos com a assimilação de fontes alternativas de nitrogênio (ATKINSON *et al.*, 1994, ARCONDÉGUY, JACK & MERRICK, 2001). Sob condições de suficiência de nitrogênio, altos níveis de glutamina levam a inibição da reação de uridililação de GlnB pela proteína GlnD e GlnB fica preferencialmente na forma desuridililada (MERRICK & EDWARDS, 1995; ARCONDÉGUY, JACK & MERRICK, 2001). GlnB desuridililada estimula adenilação de GS pela ATase, inativando-a (MERRICK & EDWARDS, 1995). Em condições de suficiência, a correta regulação da atividade da glutamina sintetase (GS), responsável por grande parte da assimilação da amônia, limita a taxa de assimilação de nitrogênio (NINFA & ATKINSON, 2000). Além da ATase, GlnB desuridililada também pode associar-se diretamente com NtrB, estimulando sua atividade de fosfatase em defosforilar NtrC que nesta forma é transcricionalmente inativa (NINFA & ATKINSON, 2000; ARCONDÉGUY, JACK & MERRICK, 2001; LEIGH & DODSWORTH, 2007).

A proteína GlnK também é substrato da enzima GlnD, podendo ser uridililada ou desuridililada em resposta aos níveis de nitrogênio da célula (ATKINSON & NINFA, 1999). A formação do complexo GlnK-AmtB em *E. coli* depende do estado de uridililação de GlnK. Em baixos níveis de nitrogênio, GlnK é uridililada e está livre no citosol e, quando a concentração celular de nitrogênio aumenta, GlnK é desuridililada e liga-se a AmtB, inibindo a captação e transporte de amônio (JAVELLE *et al.*, 2004; LEIGH & DODSWORTH, 2007). A associação de GlnK com AmtB é inibida na presença de 2OG, ATP e por uridililação. Assim, como esperado, moléculas efetoras agem como indicadoras dos níveis de nitrogênio. Em *E. coli* a proteína AmtB também é necessária para desuridililação de GlnK. Inicialmente acreditava-se que AmtB era um sensor extracelular para o amônio (JAVELLE *et al.*, 2004; JAVELLE & MERRICK, 2005), entretanto AmtB parece agir apenas como um canal para passagem de amônia e a regulação ocorre quando a amônia entra na

célula e é incorporada a glutamina, aumentando os níveis de metabólitos e deixando GlnK na sua forma desuridilada (LEIGH & DODSWORTH, 2007).

FIGURA 1 - SENSOREAMENTO E CONTROLE DO NÍVEL DE NITROGÊNIO INTRACELULAR EM *E. coli*



Em condições limitantes de nitrogênio, GlnD uridiliza as proteínas tipo PII (GlnB e GlnK), alterando a conformação e a interação com seus alvos. GlnB-UMP não interage com NtrB, que na forma livre fosforila NtrC. A interação com AmtB não ocorre quando GlnK está uridilada, permitindo a entrada de íons amônio. Em condições suficientes de nitrogênio, a ligação da glutamina a GlnD faz com que a enzima leve a desuridilação das proteínas PII. A forma desuridilada de GlnB liga-se a proteína histidina quinase NtrB, que defosforila NtrC. A proteína GlnK desuridilada interage com AmtB para impedir a entrada de íons amônio (FONTE: DIXON & KAHN, 2004; LEIGH & DODSWORTH, 2007).

Assim como GlnB, GlnK pode controlar a atividade de GS *in vitro* em *E. coli*, porém de forma menos eficiente que GlnB, sugerindo que *in vivo*, quando GlnB está presente, GlnK não tem um papel importante no controle da GS (ATKINSON & NINFA, 1998 e 1999). GlnK também pode agir através de NtrB para regular a concentração de NtrC fosforilada, mas parece ser menos potente que GlnB em controlar os níveis de NtrC-P (ARCONDÉGUY, JACK & MERRICK, 2001). Diferente de *glnB* que tem expressão constitutiva, a expressão de *glnK* é induzida quando há deficiência em nitrogênio. Assim, GlnB e GlnK constituem um sistema regulatório onde GlnB é o primeiro sensor de nitrogênio em condições de suficiência e GlnK opera para ajustar as perturbações que ocorrem durante o período de ausência de nitrogênio e, embora uma possa substituir a outra, em diferentes organismos elas podem apresentar funções distintas e específicas (ATKINSON & NINFA, 1998 e 1999).

1.6 PROTEÍNA NIFA

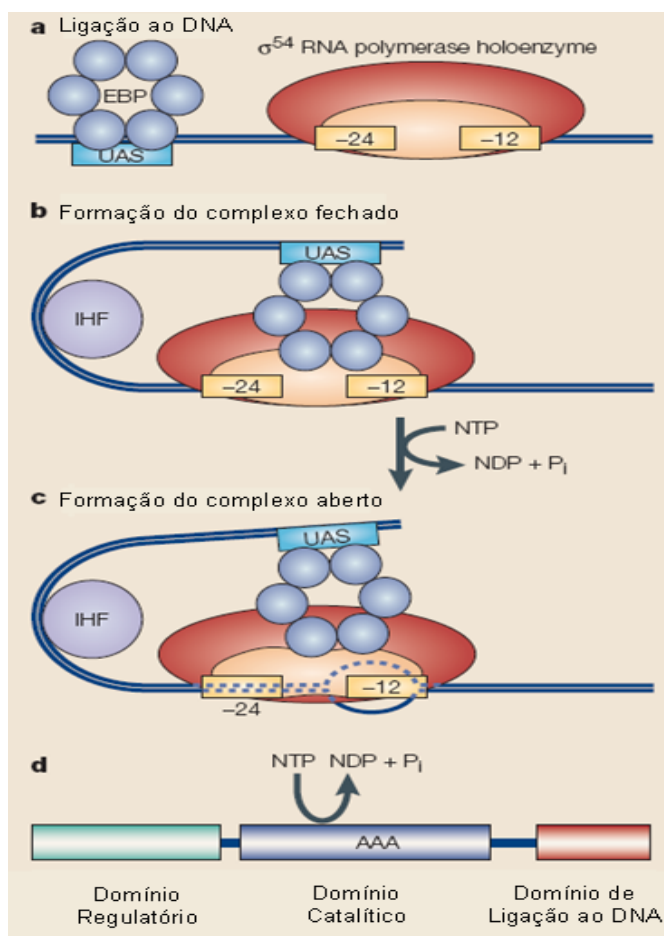
A proteína NifA, codificada pelo gene *nifA*, é um ativador específico da transcrição dos genes *nif*, que são expressos a partir de promotores dependentes do fator σ^{54} da RNA-polimerase. Esta subunidade sigma, também conhecida como RpoN, NtrA ou σ^N não possui homologia com outros fatores sigma, como por exemplo a família σ^{70} (BUCK & CANNON, 1992; QURESHI *et al.*, 1997). O fator σ^{54} associa-se reversivelmente ao núcleo da RNA-polimerase para reconhecer promotores com sequências consenso TGGCAC-N₅-TTGCA/T, que possui nas posições a -25/-24 e -13/-12 pb os nucleotídeos GG e GC quase que invariavelmente conservados (BARRIOS, VALDERRAMA, MORETT, 1999; DIXON & KAHN, 2004). A formação do complexo aberto pela holoenzima RNA polimerase- σ^{54} é dependente de proteínas ativadoras que catalisam este passo de isomerização, geralmente com hidrólise de ATP (QURESHI *et al.*, 1997). As proteínas NifA e NtrC são reguladores transcricionais para a expressão dos genes dependentes de σ^{54} envolvidos no processo de fixação de nitrogênio (FISCHER, 1994).

A proteína NifA apresenta três domínios funcionais e estrutura similar a dos demais membros da família de proteínas “Enhancer-Binding Protein” (EBP) como indicado na figura 2 (ZHANG *et al.*, 2002; DIXON & KAHN, 2004). As EBP's são uma classe de ativadores transcricionais dependentes do fator σ^{54} da RNA-polimerase, que se ligam a sequências específicas no DNA, as UAS (“Upstream Activating Sequence”) e em alguns casos interagem com a holoenzima RNA polimerase- σ^{54} através de uma curvatura no DNA provocada pela proteína IHF (Fator de Integração ao Hospedeiro). A IHF liga-se em sítios localizados entre a região promotora e os sítios onde estão as proteínas ativadoras (PAREKH & HATFIELD, 1996) e facilita a interação entre proteínas ativadoras e a RNA polimerase em muitos promotores dependentes de σ^{54} . Esta interação é necessária para induzir a formação do complexo aberto e o início da transcrição (STUDHOLME & DIXON, 2003; DIXON & KAHN, 2004). Este mecanismo é comum a todas proteobactérias fixadoras de nitrogênio (DIXON & KAHN, 2004).

Os domínios característicos das proteínas NifA são: N-terminal, Central e C-terminal (figura 2). O domínio N-terminal está envolvido com funções regulatórias e possui baixa similaridade com o de outras proteínas NifA. Contém um domínio GAF, que é capaz de ligar pequenas moléculas regulatórias, que incluem nucleotídeos cíclicos (HO *et al.*, 2000; STUDHOLME & DIXON, 2003). Embora tenha sido demonstrado que os domínios GAF de diferentes NifA possuam um papel regulatório, em muitos casos o mecanismo preciso de regulação não está claro (STUDHOLME & DIXON, 2003). O domínio central ou domínio ATPase AAA⁺ (“ATPases Associated with diverse cellular Activities”) conservado possui dois potenciais sítios para ligação de ATP e é responsável pela interação com a holoenzima RNA polimerase- σ^{54} , atividade ATPase, formação do complexo aberto e ativação da transcrição (FISCHER, 1994; ZHANG *et al.*, 2002). Membros da família AAA⁺ normalmente funcionam na forma oligomérica, frequentemente formando estruturas na forma de anéis hexaméricos (ZHANG *et al.*, 2002). O domínio C-terminal contém o motivo hélice-volta-hélice que é requerido para o reconhecimento das UAS e ligação ao DNA. Estes domínios usualmente são ligados pelas curtas sequências interdomínios LQ (N-terminal a Central) e LID (Central a C-terminal) (HO *et al.*, 2000; STUDHOLME & DIXON, 2003). A região interdomínio LQ é geralmente encontrada em proteínas moduladoras de sistemas de transdução e é denominada

“Q-linker”, devido ao alto conteúdo de resíduos de glutamina e outros aminoácidos hidrofílicos (FISCHER, 1994).

FIGURA 2 - ATIVAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO E ESTRUTURA MODULAR DAS “ENHANCER-BINDING PROTEIN”



Modelo esquemático de formação do complexo aberto e ativação da transcrição pelas EBP's. **a)** A proteína EBP liga-se a seqüência UAS no DNA (que geralmente ficam 100 pb a montante do do sítio de início da transcrição). **b)** Curvatura no DNA provocada pela proteína IHF facilita a interação da proteína ativadora com a polimerase. A ligação de IHF aproxima a proteína ativadora e a holoenzima RNA polimerase- σ^{54} . **c)** E a hidrólise nucleotídica promovida pela proteína ativadora promove a conversão do complexo fechado para complexo aberto; **d)** As “Enhancer-binding protein” (EBP's) são proteínas ativadoras de transcrição que interagem com a RNA polimerase- σ^{54} . A estrutura modular das EBP's compreende pelo menos 3 domínios: amino-terminal ou regulatório, central ou catalítico e carboxi-terminal que é o domínio de ligação ao DNA (FONTE: DIXON & KAHN, 2004).

Apesar de NifA apresentar similaridade com a proteína NtrC ela não é uma proteína clássica da família de reguladores de resposta de sistema de dois componentes, mas o domínio N-terminal da proteína NifA constitui um módulo regulatório e tem um importante papel no controle da ativação transcricional (STUDHOLME & DIXON, 2003). Em muitos diazotrofos membros das classes α e β Proteobacteria, a proteína NifA responde aos níveis de oxigênio e um motivo de cisteínas localizado entre os domínios central+C-terminal parece estar implicado com esta resposta (FISHER, 1994).

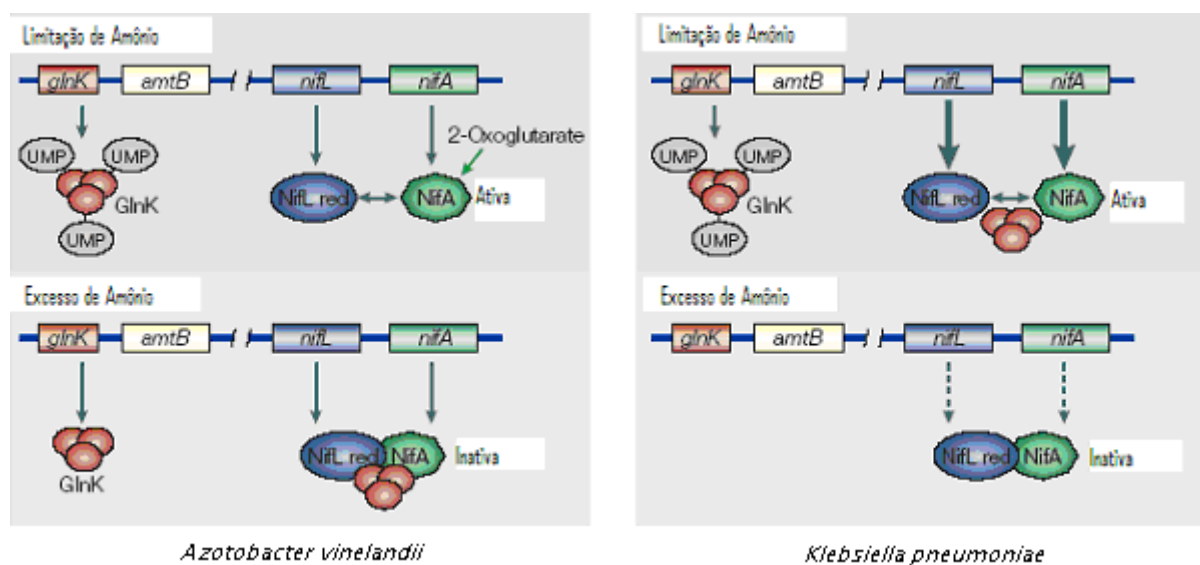
1.6.1 Controle da atividade de NifA em diferentes organismos

A atividade de NifA pode ser regulada em resposta aos níveis de nitrogênio e oxigênio intracelular e o mecanismo dessa regulação varia de acordo com o organismo (MERRICK & EDWARDS, 1995).

Em organismos da classe γ Proteobacteria, como por exemplo, *Klebsiella pneumoniae* e *Azotobacter vinelandii*, as proteínas NifA não são sensíveis a oxigênio e ao amônio (FISCHER, 1994). Nestes organismos o gene *nifA* é co-transcrito com *nifL* e este codifica a proteína anti-ativadora NifL, que regula a atividade de NifA em resposta ao oxigênio e ao nitrogênio fixado (HILL *et al.*, 1996; HE *et al.*, 1997, REYES-RAMIREZ *et al.*, 2002). Em condições de suficiência de nitrogênio, NifL interage com a NifA formando um complexo inibitório e inibindo a atividade ATPásica do domínio AAA⁺ e de ligação ao DNA (MERRICK *et al.*, 1992; MONEY *et al.*, 1990; MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2004b). Uma correta estequiometria entre NifA e NifL parece ser essencial para o controle da fixação de nitrogênio, uma vez que a síntese em excesso de NifA pode aumentar substancialmente a quantidade dos produtos dos genes *nif* sob condições nas quais eles sejam desnecessários (GOVANTES *et al.*, 1996).

K. pneumoniae e *A. vinelandii* possuem sistemas NifL-NifA similares e em ambos NifA é ativa em condições de limitação de nitrogênio e inativa em condições de suficiência, porém os mecanismos de controle são diferentes (figura 3).

FIGURA 3 - REGULAÇÃO DOS SISTEMAS NIFL-NIFA DE *A. vinelandii* E *K. pneumoniae* EM RESPOSTA AOS NÍVEIS DE NITROGÊNIO



Em *A. vinelandii* GlnK uridililada (condições limitantes de nitrogênio) não interage com NifL, mas é a ligação de 2-oxoglutarato ao domínio GAF da NifA que libera esta da inibição por NifL. Sob condições de excesso de nitrogênio, GlnK está desuridililada e a inibição ocorre pela formação do complexo GlnK-NifL-NifA. Em contraste com o sistema NifL-NifA de *A. vinelandii*, em *K. pneumoniae* sob condições limitantes de nitrogênio, a expressão de GlnK previne a inibição de NifA por NifL. Sob condições de excesso de nitrogênio NifL passa a inibir NifA. (FONTE: DIXON & KAHN, 2004; MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2004b).

Como em outras proteobactérias, *A. vinelandii* codifica proteínas necessárias para o controle geral da fixação, incluindo proteína GlnK, GlnD e o sistema de dois componentes NtrB-NtrC. Neste organismo o estado de uridililação da proteína GlnK exerce um papel importante na regulação da transcrição dos genes *nif*. Sob condições de excesso de nitrogênio, GlnK está desuridililada e interage com NifL promovendo a formação do complexo ternário GlnK-NifL-NifA, ativando a função inibitória de NifL sobre a proteína NifA (BARRET *et al.*, 2001; LITTLE *et al.*, 2002; MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2004b).

Os sinais metabólicos ADP e 2-oxoglutarato, que controlam as interações das proteínas PII com seus alvos, são importantes moduladores da interação NifL-NifA em *A. vinelandii* (DIXON & KAHN, 2004). Sob condições de fixação de nitrogênio, a ligação de 2-oxoglutarato ao domínio GAF da NifA e a uridililação de GlnK, previnem a inibição de NifA por NifL. A interação com 2-oxoglutarato altera a conformação do domínio GAF, diminuindo a afinidade por NifL e assim liberando NifA do complexo ternário, ativando-a. Enquanto que, em condições de suficiência, a ligação de ADP a NifL aumenta a afinidade desta proteína a NifA e estabiliza o complexo NifL-NifA, favorecendo a inibição (MONEY *et al.*, 1999; DIXON & KAHN, 2004)

Em *K. pneumoniae* duas proteínas tipo PII (GlnB e GlnK) são importantes sensores dos níveis de nitrogênio. A proteína GlnB é capaz de controlar a atividade do sistema regulatório de dois componentes NtrB-NtrC e o nível de NtrC fosforilada controla a expressão da proteína GlnK e das proteínas NifL e NifA através da ativação dos promotores *glnKamtB* e *nifLA*, respectivamente. Neste organismo, a proteína NifL também controla a atividade da proteína NifA em resposta aos níveis de nitrogênio e oxigênio. Este controle é mediado pela proteína GlnK, mas não se sabe ao certo como GlnK influencia a localização de NifL em resposta ao nível de amônio (HE *et al.*, 1998; JACK *et al.*, 1999). Supostamente, sob condições de limitação de nitrogênio fixado e anaerobiose, a proteína NifL está associada a membrana enquanto que, na presença de oxigênio e amônio, ela encontra-se na fração citosólica, indicando que o seqüestro de NifL para a membrana citoplasmática constitui o principal mecanismo de controle da atividade de NifA por NifL (STIPS *et al.*, 2004).

Em contraste com *A. vinelandii*, em condições limitantes de nitrogênio, a proteína GlnK de *K. pneumoniae* não precisa estar na sua forma uridililada para liberar NifA da inibição por NifL (HE *et al.*, 1998), já em condições de excesso de

nitrogênio fixado, NifA é inativa (JAVELE, 2004) devido a formação do complexo inibitório NifL-NifA (STIPS *et al.*, 2004).

Em algumas bactérias diazotróficas nas quais a proteína NifL não está presente, há evidências de que as proteínas transdutoras de sinal do tipo PII modulam direta ou indiretamente a atividade de NifA através do domínio GAF (que corresponde a quase totalidade do domínio N-terminal) e além disso, essas proteínas NifA apresentam um motivo cisteínas (Cys-X₄-Cys) que estaria relacionado com a sensibilidade ao oxigênio (FISCHER, 1994).

Em *Azospirillum brasilense* a atividade da NifA parece ser regulada de acordo com os níveis de amônio, por um mecanismo mediado pela proteína GlnB (LIANG *et al.*, 1992) que é essencial para a fixação de nitrogênio e sua forma uridililada parece ser requerida para ativar NifA em condições limitantes de amônio (ARSENE *et al.*, 1996). Em suficiência de nitrogênio, o domínio N-terminal da NifA aparentemente inibe sua atividade, provavelmente porque GlnB seja incapaz de manter NifA na forma ativa. Essa sugestão é decorrente de experimentos utilizando a proteína NifA N-truncada (sem o domínio N-terminal) que permanece ativa na presença de amônio e na ausência de PII, indicando que o domínio N-terminal participa da regulação da atividade da NifA por amônio, juntamente com a proteína PII (ARAUJO *et al.*, 2004; ARSENE *et al.*, 1996).

Em *Rodhobacter capsulatus* existem duas cópias funcionais do gene *nifA*, denominados *nifA1* e *nifA2*, que codificam proteínas NifA que diferem somente em 3 aminoácidos da extremidade N-terminal (MASEPOHL *et al.*, 1988). Ambas as proteínas são capazes de ativar a expressão dos genes estruturais da nitrogenase e tem sido sugerido para *R. capsulatus*, um mecanismo regulatório similar ao de enterobactérias (MASEPOHL *et al.*, 2002). Neste organismo as proteínas GlnB e GlnK estão envolvidas na inibição da atividade da proteína NifA na presença de íons amônio, uma vez que a inibição desta proteína por íons amônio é eliminada no duplo mutante *glnB/glnK* (DREPPER *et al.*, 2003). Estudos de interação entre GlnB, GlnK, NifA1 e NifA2 sugerem que as proteínas PII atuem diretamente na regulação das proteínas NifA (PAWLOWSKI *et al.*, 2003). Ao contrário da proteína NifA de *A. brasilense*, na qual a deleção do domínio N-terminal tornou a proteína NifA ativa e tolerante a amônia, mutantes NifA1 de *R. capsulatus* que tiveram o domínio N-terminal eliminado total ou parcialmente, tornaram-se completamente inativos, tanto

em *E. coli* quanto em *R. capsulatus* (PASCHEN et al., 2001), indicando que o domínio N-terminal é essencial para a atividade da NifA neste microrganismo.

Em *Rhodospirillum rubrum*, três proteínas do tipo PII estão presentes: GlnB, GlnK e GlnJ. Porém, apenas proteína GlnB pode diretamente interagir com NifA. É na sua forma uridililada que GlnB é capaz de ativar NifA em condições limitantes de nitrogênio neste organismo. Nem GlnK e nem GlnJ podem substituir GlnB na ativação de NifA (ZHANG et al., 2004). Em *A. caulinodans* as proteínas GlnB e GlnK também estão envolvidas na inibição da atividade da proteína NifA na presença de íons amônio e tanto GlnB quanto GlnK podem controlar esta atividade. Neste organismo, assim como acontece em *R. capsulatus*, a proteína NifA N-truncada é inativa (MICHEL-REYDELLET & KAMINSKI, 1999). Em organismos como *S. meliloti* e *B. japonicum*, onde a proteína NifL não está presente, a atividade de NifA responde aos níveis de oxigênio (HUALA et al., 1990; DIXON & KAHN, 2004) e a degradação aeróbica pode contribuir para a regulação pós-traducional da atividade de NifA (FISCHER, 1994).

1.7 *Herbaspirillum seropedicae*

H. seropedicae é um diazotrofo, pertencendo a classe das β -Proteobactéria que foi isolado em 1986 por BALDANI e colaboradores de raízes de diferentes gramíneas e posteriormente do interior de raízes, colmos (caule) e folhas de milho, sorgo, arroz, cana-de-açúcar (não no interior das folhas) e algumas espécies de gramíneas forrageiras e palmeiras oleaginosas (OLIVARES et al., 1996; BALDANI et al., 1997, RONCATO-MACCARI et al., 2003). É uma bactéria endofítica obrigatória, gram-negativa, móvel, vibrióide, capaz de fixar nitrogênio sob condições microaeróbicas. (BALDANI et al., 1986). Assim como outros microrganismos endofíticos, *H. seropedicae* não cresce bem em solo natural, sendo sua sobrevivência menos afetada em solo estéril, o que indica que fatores biológicos interferem na sua sobrevivência (BALDANI et al., 1997).

Roncato-Maccari e colaboradores (2003) demonstraram que, em plantas colonizadas por *H. seropedicae* ocorre a expressão dos genes *nif*, sugerindo que os tecidos infectados propiciem um ambiente favorável à fixação de nitrogênio e proliferação bacteriana. Algumas estirpes de *H. seropedicae* são eficientes na

fixação do nitrogênio em arroz e podem aumentar em até 30% a produção de grãos. Além disso, estudos revelaram que a inoculação do arroz com este microrganismo resulta também na produção de um grão com maior teor protéico (<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2005/marco/noticia.2005-03-07.9754551895/?searchterm=Herbaspirillum>). Além de fixar nitrogênio, *H. seropedicae* pode fornecer fitormônios para a planta, como ácido indolacético (AIA) e giberelinas favorecendo, dessa forma, seu desenvolvimento (BÁSTIAN *et al.*, 1998; RADWAN, MOHAMED, REIS, 2004).

1.7.1 Organização e regulação dos genes *nif* de *H. seropedicae*

Em *H. seropedicae* os genes *nif* já foram seqüenciados e estão organizados em uma única região de aproximadamente 37 kb, que contém alguns genes já caracterizados como *nifA* e *nifB* (SOUZA *et al.*, 1991a), o operon *nifHDKENX* (MACHADO *et al.*, 1996, KLASSEN *et al.*, 2003), *nifQmodABC* e *fixXC* (PEDROSA *et al.*, 2001), além de outros genes envolvidos na fixação de nitrogênio (figura 4) (GENOPAR).

A transcrição dos genes envolvidos com a fixação é estritamente regulada em *H. seropedicae*, uma vez que a fixação de nitrogênio ocorre em condições microaeróbicas (devido a sensibilidade do complexo nitrogenase ao oxigênio) e responde ainda aos níveis de nitrogênio fixado. Além disso, envolve o sistema Ntr e uma via de transdução de sinais específica para os genes *nif* que é regulada pelas proteínas NifA e PII (SOUZA *et al.*, 1991a; SOUZA *et al.*, 1991b; PEDROSA *et al.*, 2001). A síntese de uma nitrogenase ativa requer a transcrição de um grande número de genes *nif* e a proteína NifA é responsável pela transcrição destes genes. Análises transcricionais revelaram que todo o operon *nifHDK* é transcrito a partir de um promotor único tipo -24/-12 localizado a montante do gene *nifH* (KLASSEN *et al.*, 1999), que contém além de uma seqüência homóloga de promotores dependentes de σ^{54} , dois sítios para ligação de NifA e um sítio para ligação de IHF (MACHADO *et al.*, 1996).

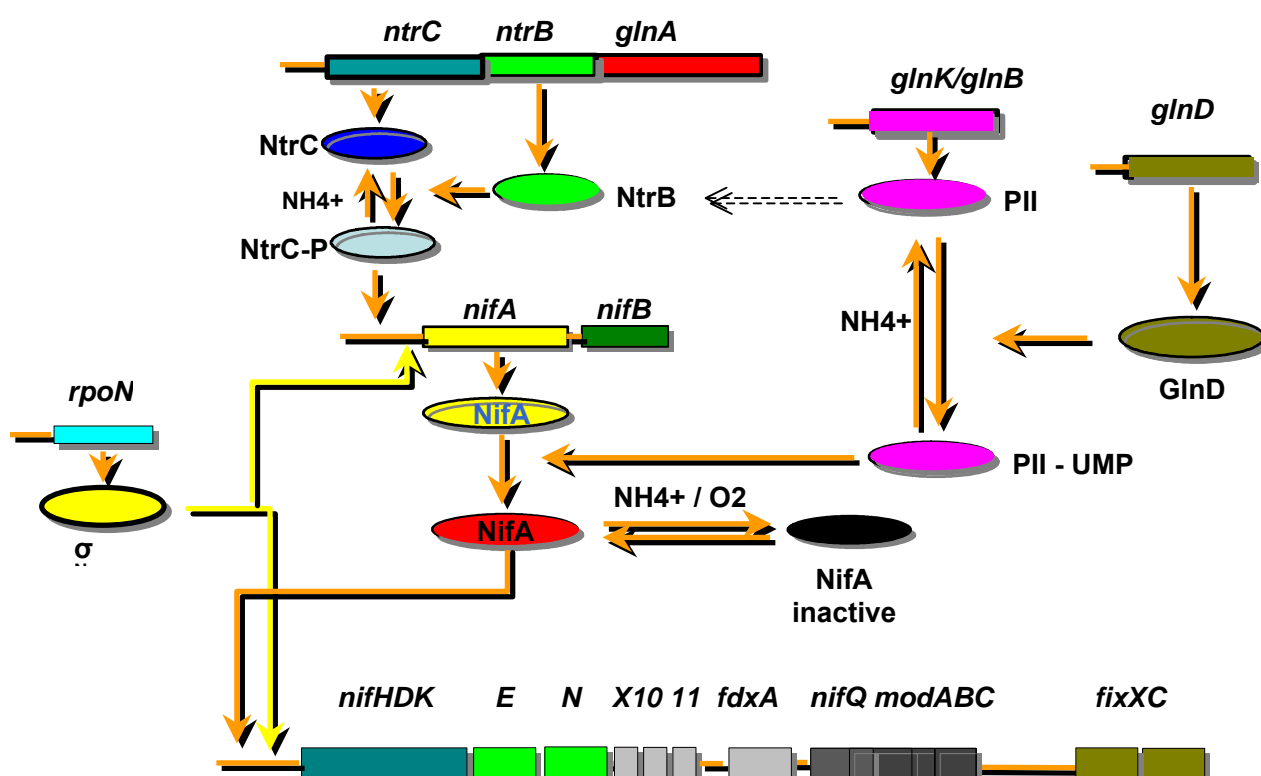
al., 2001). Em condições limitantes de nitrogênio, a expressão de *glnA* é dependente de NtrC, porém é parcialmente reprimida em altas concentrações de amônio, sugerindo funcionalidade do promotor σ^{70} nestas condições (PERSUHN *et al.*, 2000). Os resultados obtidos por Persuhn e colaboradores (2000), demonstraram ainda, o envolvimento do sistema Ntr na expressão do gene *glnA*, controle da atividade de GS e regulação da fixação de nitrogênio.

Duas proteínas do tipo PII foram identificadas em *H. seropedicae*, GlnB e GlnK (BENELLI *et al.*, 1997; NOINDORF, 2002). A proteína GlnB tem expressão constitutiva (BENELLI *et al.*, 1997), enquanto que a expressão da proteína GlnK é aumentada sob condições limitantes de nitrogênio e é dependente de NtrC (NOINDORF, 2002). O gene *glnB* foi isolado e caracterizado e a estrutura tridimensional de seu produto protéico foi determinada. Esta estrutura é similar a da proteína GlnK de enterobactérias e possui um papel no controle da atividade de NifA, porém não está envolvida com o controle da atividade de GS por adenililação/desadenililação (BENELLI *et al.*, 1997, 2001 e 2002). O gene *glnK* é co-transcrito com o gene *amtB* (NOINDORF, 2002). As proteínas GlnK e GlnB de *H. seropedicae* apresentam 78% de identidade entre si e ambas podem ser uridililadas (BENELLI *et al.*, 2001). A uridililação no resíduo Tyr-51 é conservada tanto em GlnB quanto em GlnK e é dependente de ATP e 2-oxoglutarato e inibida na presença de glutamina (BENELLI *et al.*, 2001; BONATTO *et al.*, 2007)

Recentemente Noindorf e colaboradores (2006) isolaram e sequenciaram o gene *amtB* de *H. seropedicae*. Este gene é co-transcrito com *glnK* e *orf1* formando o operon *orf1glnKamtB*. A expressão deste operon é aumentada em condições de fixação de nitrogênio e é dependente de NtrC. A proteína AmtB é necessária para captação de metilamônio em *H. seropedicae* e provavelmente está envolvida no transporte de amônio.

A figura 5 mostra a inter-relação dos genes e proteínas envolvidos no provável mecanismo de regulação do processo de fixação em *H. seropedicae*.

FIGURA 5 – MODELO DE REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *nif* EM *H. seropedicae*.



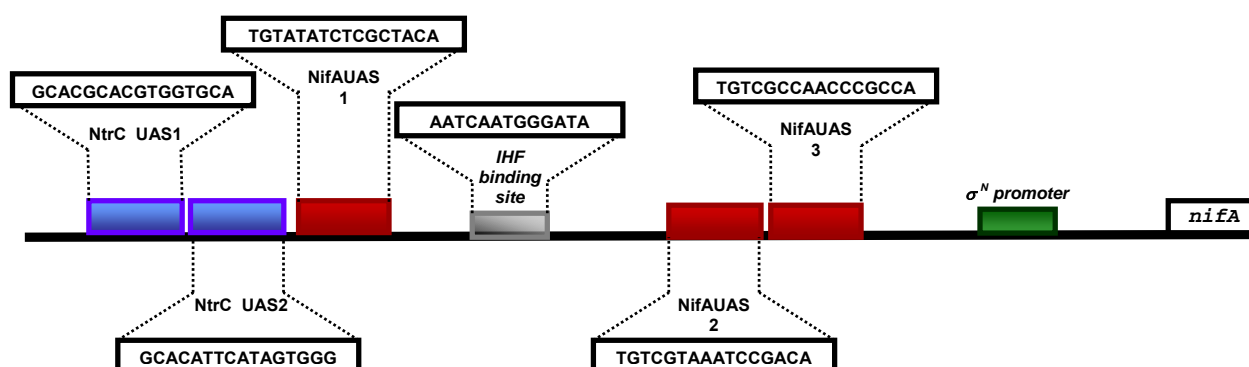
Propõe-se que, sob condições de fixação de nitrogênio, NtrB na sua forma ativa é capaz de fosforilar NtrC. NtrC-P por sua vez, ativa a transcrição do promotor de *nifA* juntamente com a RNA polimerase- σ^{54} . PII uridililada interage também com NifA, liberando-a de sua autoregulação e NifA ativa a transcrição dos genes *nif*. Em condições suficientes de nitrogênio, PII estaria desuridililada e as proteínas NtrC e NifA inativadas (FONTE: FÁBIO PEDROSA, PROJETO GENOPAR).

1.7.2 Controle da expressão de *nifA* em *H. seropedicae*

Em *H. seropedicae* o gene *nifA* consiste de uma unidade transcricional independente e é expresso a partir de uma região promotora complexa onde foram encontrados sítios de ligação para as proteínas NtrC, NifA e IHF (figura 6) (SOUZA *et al.*, 1991a, WASSEM *et al.*, 2000). O promotor de *nifA* é do tipo -24/-12, sua expressão é reprimida por íons amônio, mas não por oxigênio. O aumento da expressão de *nifA* sob condições de fixação de nitrogênio é primeiramente dependente da ativação do promotor -24/-12 por NtrC e auxiliado por IHF. Embora NifA não seja essencial para expressão de *nifA*, pode contribuir para total expressão pelo promotor (SOUZA *et al.*, 2000; WASSEM *et al.*, 2000). Além disso, um nível basal de expressão de *nifA* está presente em condições de repressão, sugerindo a presença de um promotor a montante. A organização deste promotor manteria um nível constitutivo e baixo da proteína NifA, suficiente para ativar a expressão dos genes *nif* assim que as condições tornem-se favoráveis a fixação (SOUZA *et al.*, 2000).

O aumento da concentração de NifA estimula sua própria transcrição. A auto-ativação da expressão de *nifA* requer a presença do sítio de ligação para NifA, localizado 36 pb a jusante do sítio para ligação de IHF (NifA-UAS2, figura 6). A medida que os níveis intracelulares de NifA aumentam, IHF inibe a ativação do promotor *nifA* pela proteína NifA recém sintetizada. Isso evita o acúmulo de NifA, o que seria potencialmente danoso às células. Então, a medida que a concentração de NifA aumenta, IHF promove inibição da transcrição do promotor *nifA*, mesmo na presença de NtrC, por um mecanismo de “feedback”. Sendo assim, IHF exerce duas funções no promotor de *nifA*: agir positivamente na ativação dependente de NtrC e negativamente na ativação dependente de NifA (WASSEM *et al.*, 2000, WASSEM *et al.*, 2002).

FIGURA 6 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DA REGIÃO PROMOTORA DE NIFA DE *H. seropedicae*.

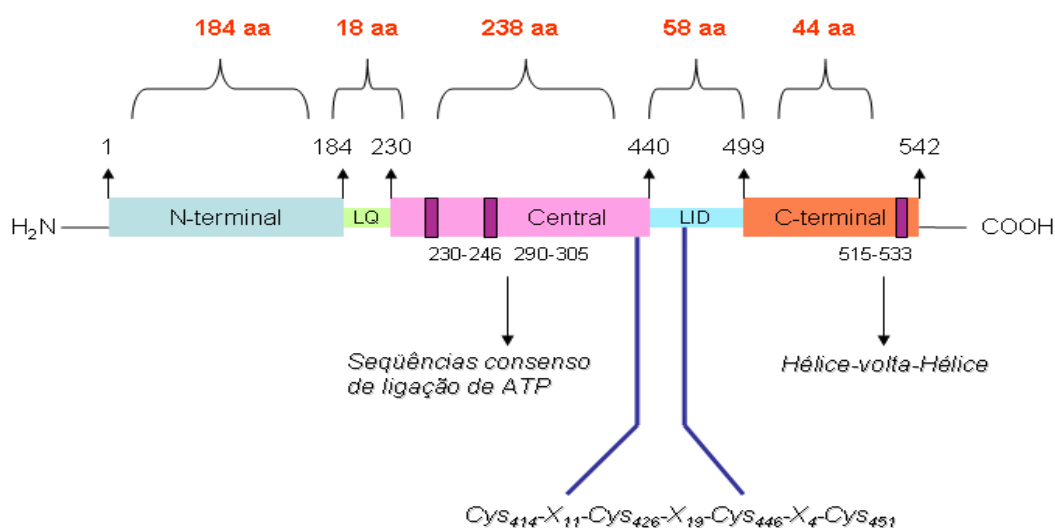


Estão presentes a montante do promotor σ^N de *nifA* dois sítios para ligação de NtrC (NtrC UAS1 e UAS2), três sítios para ligação de NifA (NifA UAS1, UAS2 e UAS3) e um sítio para ligação de IHF. A ação conjunta de NtrC, NifA e IHF no promotor *nifA* de *H. seropedicae* é essencial para um controle rigoroso da concentração intracelular da proteína NifA em resposta aos níveis de amônio e oxigênio (FONTE: adaptação PEDROSA *et al.*, 2001; WASSEM *et al.*, 2000).

1.7.3 Controle da atividade da proteína NifA em *H. seropedicae*

A proteína NifA de *H. seropedicae* apresenta 542 resíduos de aminoácidos, contidos em três domínios estruturais (N-terminal, Central e C-terminal) e duas regiões interdomínios LID e LQ (“Q-linker”) (SOUZA *et al.*, 1991b), com características semelhantes as demais proteínas NifA (item 1.4 e figuras 2 e 7).

**FIGURA 7 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ESTRUTURA DA PROTEÍNA
NIFA DE *H. seropedicae***



O domínio N-terminal é pouco conservado e está envolvido com a sensibilidade ao amônio. O domínio Central possui um motivo característico de ligação ao ATP (provavelmente envolvido na interação com a subunidade σ^{54} da RNA polimerase e com a formação do complexo aberto). O domínio C-terminal possui um motivo Hélice-volta-Hélice (HTH), responsável pela ligação ao DNA. O motivo de cisteínas localizado entre o domínio Central e o LID constitui um potencial sítio para ligação de metais e é essencial para atividade de NifA (FONTE: MONTEIRO *et al.*, 2003a modificado; SOUZA *et al.*, 1991b, SOUZA *et al.*, 1999).

O controle da atividade da proteína NifA de *H. seropedicae* tem sido investigado tanto em sistemas “in vivo” quanto “in vitro” (SOUZA *et al.*, 1999; MONTEIRO *et al.*, 1999a; MONTEIRO *et al.*, 1999b; MONTEIRO *et al.*, 2001a, MONTEIRO *et al.*, 2003a). NifA é controlada negativamente pelos níveis de oxigênio e íons amônio e é dependente de ferro (SOUZA *et al.*, 1999). A sensibilidade ao oxigênio e ao ferro parece estar relacionada ao domínio Central+C-terminal desta

proteína (SOUZA *et al.*, 1999; MONTEIRO *et al.*, 1999a) e a regulação por nitrogênio envolve o domínio N-terminal de NifA, que aparentemente, responde aos níveis de amônia ou glutamina através da interação com proteínas tipo PII (SOUZA *et al.*, 1999).

A proteína NifA de *H. seropedicae* é insolúvel quando superexpressa em *E. coli* e por isso a dificuldade de estudos sobre esta proteína “in vitro” (SOUZA *et al.*, 1999). Entretanto, NifA N-truncada (que não contém o domínio N-terminal) mostrou-se mais solúvel e pôde ser purificada em *E. coli* e caracterizada “in vivo” e “in vitro” (MONTEIRO *et al.*, 1999a; MONTEIRO, 2001). Os domínios N-terminal, Central e C-terminal também foram purificados e caracterizados (MONTEIRO *et al.*, 1999b; MONTEIRO, 2001; MONTEIRO *et al.*, 2003a).

Experimentos para verificar a capacidade de ligação destes domínios ao DNA mostraram que, tanto a proteína NifA N-truncada, quanto o domínio C-terminal purificado, foram capazes de ligar a região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* (MONTEIRO *et al.*, 1999a, MONTEIRO *et al.*, 2003a). Em *E. coli* a proteína NifA N-truncada é capaz de ativar a transcrição da fusão *nifH::lacZ* de *K. pneumoniae* independente da concentração de amônia, porém somente na ausência de oxigênio, confirmando a hipótese de que a sensibilidade a amônia envolve o domínio N-terminal e a sensibilidade ao oxigênio está relacionada aos demais domínios (SOUZA *et al.*, 1999, MONTEIRO *et al.*, 1999a,b). Porém o domínio N-terminal é capaz de interagir diretamente com a proteína NifA N-truncada em “trans”, inibindo as atividades de ATPase e de ligação ao DNA desta “in vivo” e “in vitro” em resposta ao nitrogênio fixado, e restabelecer o controle negativo por amônia (MONTEIRO *et al.*, 1999b; MONTEIRO *et al.*, 2001a). A atividade da proteína NifA N-truncada em *E. coli* requer ainda a proteína Fnr (transdutor de sinal que contém ferro) e tanto a perda de Fnr, a exposição ao oxigênio ou a depleção de ferro, tornam a proteína NifA mais susceptível a degradação, possivelmente através da proteólise (MONTEIRO *et al.*, 2003b).

Em *E. coli* a proteína NifA selvagem de *H. seropedicae* apresenta-se inativa, indicando que é inerte quando expressa em enterobactérias, porém quando co-expressa com a proteína GlnB de *A. brasilense* é capaz de agir como ativadora da transcrição de *nifH*. Monteiro e colaboradores (2001) sugerem que a regulação da atividade de NifA envolve seu próprio domínio N-terminal. Este controlaria a atividade da proteína por uma interação direta com os domínios Centra+C-terminal,

provavelmente facilitada pela presença de um sinal e as proteínas PII seriam as moléculas sinais promotoras da inibição de NifA dependente de amônio. Acredita-se que a regulação da atividade de NifA por amônia possa envolver tanto GlnB quanto GlnK, visto que ambas interagem com NifA (MONTEIRO *et al.*, 1999a; BENELLI *et al.*, 2002b). Porém Noindorf (2006) sugere que, em condições fisiológicas a atividade de NifA seria controlada primariamente por GlnK, uma vez que um mutante *glnB* apresenta fenótipo Nif⁺ e o mutante *glnK*, fenótipo Nif⁻ (NOINDORF, 2006).

Em *H. seropedicae* a expressão de GlnK é regulada pelo sistema NtrC, havendo aumento na expressão desta proteína em células cultivadas na ausência de amônia. A adição de amônio a esta cultura levaria à inativação da proteína NifA, provavelmente devido ao impedimento da ligação desta proteína com GlnK e/ou GlnB. Este impedimento poderia ocorrer via desuridililação das proteínas PII (PII não-modificada seria incapaz de ligar NifA) ou devido ao seqüestro destas proteínas para a membrana celular via AmtB. Outra alternativa, é que a proteína NifA estaria sempre ligada a GlnK e que o estado de uridililação desta última provocaria uma mudança conformacional em NifA. Quando ligada a GlnK-UMP, NifA estaria ativa e quando ligada a GlnK não modificada, NifA estaria inativa. A proteína GlnK, envolvida no controle da atividade de NifA na presença de nitrogênio, é necessária apenas quando o domínio N-terminal da NifA está presente (NOINDORF, 2006).

Em vista das evidências de que o domínio N-terminal da proteína NifA de diversos diazotrofos está envolvido na regulação da atividade desta proteína, de acordo com os níveis de nitrogênio, busca-se elucidar estes mecanismos de controle e resultados interessantes obtidos de experimentos de mutagênese e análise do comportamento fisiológico de diferentes mutantes de NifA, foram recentemente descritos (ARSENE *et al.*, 1999; PASCHEN *et al.*, 2001; REYES-RAMIREZ *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2005; ETTO, 2006).

Em *A. brasiliense*, análises de deleções na proteína NifA demonstraram que o domínio N-terminal não é essencial para a atividade de NifA, mas é necessário para atividade ótima da proteína e sofre ação dos íons amônio (ARSENE *et al.*, 1996). A proteína GlnB também é necessária para atividade de NifA (ZHANG *et al.*, 2000), sendo que o domínio GAF, liga-se diretamente com a proteína GlnB e esta interação pode ser necessária para induzir uma mudança na conformação da proteína NifA e impedir o efeito inibitório que o domínio N-terminal exerce sobre esta proteína (CHEN *et al.*, 2005). Arsène e colaboradores (1999) demonstraram que uma

mutação em um resíduo de tirosina na posição 18 do domínio N-terminal, é capaz de produzir a forma ativa da proteína NifA sem que haja necessidade de GlnB sob condições de fixação de nitrogênio. Chen e colaboradores (2005) reportaram ainda um duplo mutante NifA-Y18/53F que apresenta uma alta atividade de nitrogenase quando comparada as mutações individuais e, apesar de ser regulado por amônio, é independente de GlnB. Em ensaios de mutagênese aleatória e mutagênese sítio-dirigida na proteína NifA1 de *R. capsulatus*, foi observado que as trocas de resíduos de aminoácidos no domínio N-terminal, como leucina na posição 66 por glutamina e de valina na posição 42 por glutamato, assim como mutações na região interdomínio LID, resultaram em mutantes NifA tolerantes a íons amônio (PASCHEN et al., 2001). Mutações realizadas no domínio GAF e no domínio catalítico AAA+ da NifA de *A. vinelandii* demonstraram que ambos os domínios estão envolvidos com a resposta a NifL, sendo que na NifA N-truncada a interação com NifL é menos estável. Mutações pontuais no domínio N-terminal também foram capazes de liberar a proteína NifA da inibição por NifL quando em excesso de amônio, mas não quando em aerobiose (REYES-RAMIREZ et al., 2002).

Etto (2006) realizou ensaio de complementação em “trans” de domínios N-terminal mutagenizados com a proteína NifA N-truncada de *H. seropedicae*. Em seu trabalho, foram obtidos os domínios N-terminal da proteína NifA contendo diferentes substituições e o ensaio de co-expressão destes domínios com NifA N-truncada foi realizado em *E. coli*. Etto demonstrou que, enquanto algumas substituições no domínio N-terminal fizeram com que este domínio mantivesse sua atividade inibitória sobre os outros domínios, outras fizeram com que a proteína NifA N-truncada mantivesse sua capacidade de ativação transcricional mesmo na presença de íons amônio. Esses resultados sugeriram que, possivelmente estes aminoácidos (substituições pontuais Y18F, L52Q, além de um domínio contendo quatro substituições aleatórias: I96V; V134E; E138V; R157H), estariam envolvidos com a atividade inibitória que o domínio N-terminal exerce sobre a proteína NifA N-truncada em altas concentrações de amônio. Para verificar se o comportamento da proteína NifA inteira contendo essas substituições no domínio N-terminal seria o mesmo observado nos ensaios realizados por Etto (2006) (que co-expressou os domínios separadamente), essas substituições, as quais fizeram com que NifA N-truncada escapasse do controle pelo domínio N-terminal na presença de amônio, foram escolhidas para o estudo no atual trabalho.

2. OBJETIVOS

A fixação de nitrogênio envolve um conjunto de proteínas conhecidas como proteínas Nif, dentre as quais a proteína NifA exerce um papel central no processo, atuando como reguladora da transcrição dos genes *nif* em resposta aos níveis de nitrogênio intracelular. Esta função envolve, particularmente, o domínio N-terminal da NifA. Para entender melhor o mecanismo pelo qual a presença de amônio regula a proteína NifA, através do seu domínio N-terminal foram isolados e caracterizados mutantes do gene *nifA* que se mostraram, em experimentos anteriores realizados, resistentes a inibição por amônio (ETTO, 2006). Assim, o presente trabalho teve como objetivos estudar as substituições, construídas por Etto (2006), no domínio N-terminal da proteína NifA de *H.seropedicae*, que apresentaram comportamento diferencial quando estes domínios N-terminal mutagenizados foram co-expressos com a proteína NifA N-truncada em *E. coli*. Para o atual estudo, estas substituições: Y18F (pETLET-Y18F), L52Q (pETLET-L52Q) e as quatro mutações aleatórias I96V, E134V, V138E e R157H (pETLET-4.2) foram realizadas no domínio N-terminal da proteína NifA íntegra.

- Obter os genes que codificam para a proteína NifA íntegras de *H. seropedicae* contendo as mutações sítio-dirigidas (Y18F, L52Q, I96V e R157H) e aleatórias no domínio N-terminal;
- Expressar as proteínas mutadas a partir dos vetores pET28a, pDK7 e pLAFR3.18;
- Avaliar o comportamento fisiológico das proteínas NifA com o domínio N-terminal mutagenizado, em *E. coli*, *A. brasilense* e *H. seropedicae*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

Os microrganismos e os plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados nas tabelas 1 e 2:

TABELA 1 - BACTÉRIAS

Estirpe	Genótipo / Fenótipo	Referência/Fonte
<i>Escherichia coli</i>		
TOP10	F ⁻ mcrA Δ(mvr – hrd RMS – mcrBC) φ 80 lacZ ΔML5 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara – leu) 7697 galU galK rpsL (Sm ^R) endA1 nupG	INVITROGEN Inc.
BL21 (λDE3) pLysS	F ⁻ , ompT, hsdS _B , (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3) (produtora da RNA polimerase do fago T7).	SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989
JM109 (DE3)	recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ (lac- proAB) F ⁻ [traD36 proAB ⁺ lacI ^q lacZΔM15] Nal ^R (produtora da RNA polimerase do fago T7)	SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989
YMC 10	lacUΔ169, endA1, thi-1, hsdR17, supE44	BACKMAN <i>et al.</i> , 1981
S17.1	RP4-2 Tc::Um Km::Tn7 tra ⁺ , recA, Sm ^R	SIMON, <i>et al.</i> , 1983
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>		
SmR1	Estirpe selvagem, Nif ⁺ , Sm ^R	SOUZA <i>et al.</i> , 2000
IM40	Estirpe Nif ⁻ , nifH::lacZ, Sm ^R , Km ^R	MACHADO, 1995
SmR54	Estirpe Nif ⁻ , Sm ^R , Km ^R , nifA ⁻ (nifA::Km)	SOUZA <i>et al.</i> , 1995
LnglnKdel	Estirpe Nif ⁻ , glnK ⁻ (SmR1 contendo deleção em fase do gene glnK), Sm ^R	NOINDORF, 2006
<i>Azospirillum brasilense</i>		
FP2	Estirpe selvagem, Nif ⁺ , Sm ^R , Nal ^R	PEDROSA & YATES, 1984
FP10	Estirpe Nif ⁻ , FP2 nifA ⁻ , Nal ^R , Sm ^R	PEDROSA & YATES, 1984

^R confere resistência ao referido antibiótico

TABELA 2 – PLASMÍDEOS

Plasmídeos	Principais Características	Referência/Fonte
pDK7	Vetor de expressão/ promotor <i>tac</i> , <i>lacI^f</i> , Cm ^R	KLEINER <i>et al.</i> , 1988
pKD7LAC-cisY18F	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com troca da tirosina 18 por fenilalanina clonada no vetor pDK7, Cm ^R	Este trabalho
pDK7LAC-cisL52Q	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com troca da leucina 52 por glutamina clonada no vetor pDK7, Cm ^R	Este trabalho
pDK7LAC-cis3	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com troca da isoleucina 96 por valina, do ácido glutâmico 134 por valina e da valina 138 por ácido glutâmico clonada no vetor pDK7, Cm ^R	Este trabalho
pDK7LAC-L14P/Y18F	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com troca da leucina 14 por prolina e da tirosina 18 por fenilalanina clonada no vetor pDK7, Cm ^R	Este trabalho
pDK7LAC-L52Q	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com troca da leucina 52 por glutamina clonada no vetor pDK7, Cm ^R	Este trabalho
pDK7LAC-I96V	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com troca da isoleucina 96 por valina clonada no vetor pDK7, Cm ^R	Este trabalho
pDK7LAC-R157H	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com troca da arginina 157 por histidina clonada no vetor pDK7, Cm ^R	Este trabalho
pDKLAC-4	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com troca da isoleucina 96 por valina, do ácido glutâmico 134 por valina, da valina 138 por ácido glutâmico e da arginina 157 por histidina clonada no vetor pDK7, Cm ^R	Este trabalho
pEMS140	Contém a fusão <i>nifB::lacZ</i> de <i>H. seropedicae</i> no vetor pPW452, Tc ^R .	REGO, 1997
pET28a	Vetor de expressão/promotor <i>T7</i> /com fusão His-tag , Km ^R	NOVAGEN
pETLAC-cisY18F	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com troca da tirosina 18 por fenilalanina clonada no vetor pET28a, Km ^R	Este trabalho
pETLAC-cisL52Q	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com troca da leucina 52 por glutamina clonada no vetor pET28a, Km ^R	Este trabalho
pETLAC-cis3	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com troca da isoleucina 96 por valina, do ácido glutâmico 134 por valina e da valina 138 por ácido glutâmico clonada no vetor pET28a, Km ^R	Este trabalho

pETLAC-L14P/Y18F	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com troca da leucina 14 por prolina e da tirosina 18 por fenilalanina clonada no vetor pET28a, Km ^R	Este trabalho
pETLAC-L52Q	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com troca da leucina 52 por glutamina clonada no vetor pET28a, Km ^R	Este trabalho
pETLAC-I96V	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com troca da isoleucina 96 por valina clonada no vetor pET28a, Km ^R	Este trabalho
pETLAC-R157H	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com troca da arginina 157 por histidina clonada no vetor pET28a, Km ^R	Este trabalho
pETLAC-4	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com troca da isoleucina 96 por valina, do ácido glutâmico 134 por valina, da valina 138 por ácido glutâmico e da arginina 157 por histidina clonada no vetor pET28a, Km ^R	Este trabalho
pETLET-Y18F	Contém a sequência codificadora do domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> com troca da tirosina 18 por fenilalanina clonada no vetor pET28a, Km ^R	ETTO, 2006
pETLET-L52Q	Contém a sequência codificadora do domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> com troca da leucina 52 por glutamina clonada no vetor pET28a, Km ^R	ETTO, 2006
pETLET-4.2	Contém a sequência codificadora do domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> com troca da isoleucina 96 por valina, do ácido glutâmico 134 por valina, da valina 138 por ácido glutâmico e da arginina 157 por histidina clonada no vetor pET28a, Km ^R	ETTO, 2006
pLAFR3.18	Vetor de ampla faixa hospedeira com sítio de policlonagem do vetor pTZ-18R, Tc ^R , Cm ^R	SOUZA, <i>et al.</i> , 1999
pLAFR3.18nifACT	Contém a sequência codificadora da região promotora e os domínios Central+C-terminal da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> clonada no vetor pLAFR3.18	NOINDORF, 2006
pLAC-cisY18F	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com troca da tirosina 18 por fenilalanina clonada no vetor pLAFR3.18, Tc ^R , Cm ^R	Este trabalho
pLAC-cisL52Q	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com troca da leucina 52 por glutamina clonada no vetor pLAFR3.18, Tc ^R , Cm ^R	Este trabalho
pLAC-cis3	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com troca da isoleucina 96 por valina, do ácido glutâmico 134 por valina e da valina 138 por ácido glutâmico clonada no vetor pLAFR3.18, Tc ^R , Cm ^R	Este trabalho
pLAC-L14P/Y18F	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com troca da leucina 14 por prolina e da tirosina 18 por fenilalanina clonada no vetor pLAFR3.18, Tc ^R , Cm ^R	Este trabalho

pLAC-L52Q	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com troca da leucina 52 por glutamina clonada no vetor pLAFR3.18, Tc ^R , Cm ^R	Este trabalho
pLAC-I96V	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com troca da isoleucina 96 por valina clonada no vetor pLAFR3.18, Tc ^R , Cm ^R	Este trabalho
pLAC-R157H	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com troca da arginina 157 por histidina clonada no vetor pLAFR3.18, Tc ^R , Cm ^R	Este trabalho
pLAC-4	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com troca da isoleucina 96 por valina, do ácido glutâmico 134 por valina, da valina 138 por ácido glutâmico e da arginina 157 por histidina clonada no vetor pLAFR3.18, Tc ^R , Cm ^R	Este trabalho
pMP220	Vetor para fusão transcricional <i>lacZ</i> , Tc ^R	SPAINK <i>et al.</i> , 1987
pMPLAC-NifA	pRAMM3 co-integrado com pMP220, Cm ^R , Tc ^R	Este trabalho
pMPLAC-ΔNNifA	pRAMM4 co-integrado com pMP220, Cm ^R , Tc ^R	Este trabalho
pMPLAC-cisY18F	pDKLAC-cisY18F co-integrado com pMP220, Cm ^R , Tc ^R	Este trabalho
pMPLAC-cisL52Q	pDKLAC-cisL52Q co-integrado com pMP220, Cm ^R , Tc ^R	Este trabalho
pMPLAC-cis3	pDKLAC-cis3 co-integrado com pMP220, Cm ^R , Tc ^R	Este trabalho
pMPLAC-L14P/Y18F	pDKLAC-DUPLO co-integrado com pMP220, Cm ^R , Tc ^R	Este trabalho
pMPLAC-L52Q	pDKLAC-L52Q co-integrado com pMP220, Cm ^R , Tc ^R	Este trabalho
pMPLAC-I96V	pDKLAC-I96V co-integrado com pMP220, Cm ^R , Tc ^R	Este trabalho
pMPLAC-R157H	pDKLAC-R157H co-integrado com pMP220, Cm ^R , Tc ^R	Este trabalho
pRAM1	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> clonada no vetor pET28a, Km ^R	MONTEIRO <i>et al.</i> , 1999
pRAM2	Contém a sequência codificadora dos domínios Central+C-terminal da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> clonada no vetor pET28a, Km ^R	MONTEIRO <i>et al.</i> , 1999
pRAMM1	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> clonada no vetor pLAFR3.18, Tc ^R , Cm ^R	OLIVEIRA, M.A.
pRAMM2	Contém a sequência codificadora dos domínios Central+C-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> clonada no vetor pLAFR3.18, Tc ^R , Cm ^R	OLIVEIRA, M.A.
pRAMM3	Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> clonada no vetor pDK7, Cm ^R	OLIVEIRA, M.A.
pRAMM4	Contém a sequência codificadora dos domínios Central+C-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> clonada no vetor pDK7, Cm ^R	OLIVEIRA, M.A.
pRT22	Contém a fusão <i>nifH::lacZ</i> de <i>K. pneumoniae</i> , Cm ^R	TULI & MERRICK, <i>et al.</i> , 1988

^R confere resistência ao referido antibiótico

3.2 MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas nos meios líquidos LB (SAMBROOK *et al.*, 1989) e meio mínimo Nitrogen-Free Davis and Mignoli (NFDm) (CANNON *et al.*, 1976) sob agitação (120 rpm) ou em meio sólido LA, para a obtenção de colônias isoladas. As culturas foram cultivadas “overnight” (15-18 horas) a 37°C. Para o preparo de células eletrocompetentes as estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio SOB (SAMBROOK *et al.*, 1989) a 37°C sob agitação a 120 rpm e após eletroporação, as células de *E. coli* foram recuperadas em meio SOC (SAMBROOK *et al.*, 1989) por 1 hora a 37°C sob agitação a 120 rpm.

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio líquido NFbHP utilizando malato como fonte de carbono e NH₄Cl (cloreto de amônio) ou glutamato como fonte de nitrogênio (KLASSEN *et al.*, 1997). As estirpes de *A. brasilense* foram cultivadas em meio líquido NFbHP utilizando lactato como fonte de carbono e NH₄Cl ou glutamato como fonte de nitrogênio (MACHADO *et al.*, 1995). As culturas foram incubadas a 30°C e sob agitação de 120 rpm por um período que variaram de 6 a 48 horas. Para obtenção de colônias isoladas, foi utilizado meio sólido NFbHP-malato/lactato acrescido de 20 mmol/L de NH₄Cl e para o teste de atividade da enzima nitrogenase as culturas foram inoculadas em frascos de 10 mL contendo 4 mL de meio semi-sólido NFbHP-malato/lactato acrescido de 0,4 mmol/L de glutamato ou 20 mmol/L de NH₄Cl. A incubação foi realizada em estufa a 30°C por períodos que variaram de 16 a 30 horas.

A composição dos meios de cultura está descrita a seguir:

- LB:

	gramas/litro
Extrato de levedura	5,0
Triptona	10,0
NaCl	10,0

- SOB:

	gramas/litro
Triptona	20,0
Extrato de levedura	5,0
NaCl	0,6
KCl	0,19
MgCl ₂	0,2

- SOC:

	gramas/litro
Extrato de levedura	5,0
Triptona	20,0
NaCl	0,6
KCl	0,19
MgCl ₂	0,94
MgSO ₄	1,2
Glucose	3,6

- Meio mínimo NFDM:

	gramas/litro
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,025
MgSO ₄	0,1
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,025

O meio NFDM foi utilizado como inóculo para os ensaios de β -galactosidase (3.19.1.1). No momento do uso, foram adicionados ao meio 20 g/L de glucose, 12,06 g/L de K₂HPO₄, 3,4 g/L de KH₂PO₄ e 8 μ L de uma solução de casaminoácidos (10 mg/mL) ou 80 μ L de NH₄Cl.

- NFb-Malato:

	gramas/litro
Ácido Nitrilo-triacético	$5,6 \cdot 10^{-2}$
MgSO ₄ .7H ₂ O	$2,0 \cdot 10^{-1}$
NaCl	$1,0 \cdot 10^{-1}$
CaCl ₂	$2,0 \cdot 10^{-2}$
FeSO ₄ .7H ₂ O	$2,0 \cdot 10^{-2}$
Ácido málico	5,0
Biotina	$1,0 \cdot 10^{-4}$
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	$2,0 \cdot 10^{-3}$
MnSO ₄ .H ₂ O	$2,35 \cdot 10^{-3}$
H ₃ BO ₃	$2,8 \cdot 10^{-3}$
CuSO ₄ .5H ₂ O	$8,0 \cdot 10^{-5}$
ZnSO ₄ .7H ₂ O	$2,4 \cdot 10^{-4}$

No momento do uso foi adicionado ao meio NFb-malato 50 mL/L de solução estéril de fosfatos (159,4 g/L de KH₂PO₄ e 17,8 g/L de K₂HPO₄) passando então a ser denominado NFbHP-malato. Como fonte de nitrogênio foi utilizado 20 mmol/L, de NH₄Cl ou glutamato nas concentrações de 0,4 mmol/L e 5 mmol/L (dependendo do ensaio). As soluções de fosfato, cloreto de amônio e glutamato foram autoclavadas separadamente e adicionadas ao meio no momento do uso.

O meio NFb-lactato continha todos os componentes do meio NFb-malato, porém o ácido málico é substituído por 5 g/L de lactato de sódio. No momento do uso foi adicionado ao meio NFb-lactato 50 mL/L de solução estéril de fosfatos (4,0 g/L de KH₂PO₄ e 6,0 g/L de K₂HPO₄) passando então a ser denominado NFbHP-lactato. Como fonte de nitrogênio foi utilizado 20 mmol/L de NH₄Cl ou glutamato na concentração de 0,4 mmol/L e 5 mmol/L (dependendo do ensaio).

Os meios sólido e semi-sólido foram obtidos pela adição de ágar bacteriológico ao meio líquido nas concentrações de 15 g/L e 1,175 g/L respectivamente. Aos meios sólidos NFbHP-malato/lactato, dez por cento da mistura de fosfatos foram adicionados antes da autoclavação para evitar hidrólise do ágar

devido a possíveis variações no pH. Todos os meios foram esterilizados por autoclavação a 120°C e 1 atmosfera de pressão durante 15 minutos.

3.2.1 Estocagem

Estoques das estirpes de *E. coli* foram mantidos em glicerol 50% a -20°C ou 15% a -70°C e das estirpes de *H. seropedicae* e *A. brasilense* foram mantidas em glicerol 50% a -20°C ou a temperatura ambiente em meio NFbHP-malato/lactato semi-sólido acrescido de 20 mmol/L de NH₄Cl.

3.2.2 Antibióticos

Os antibióticos utilizados e as suas respectivas concentrações finais estão listados na tabela 3.

TABELA 3 – ANTIBIÓTICOS

Antibióticos (Abreviatura)	Solução estoque (mg/mL)	Concentração final (µg/mL)
Ampicilina (Amp)	250	250 ^a
Canamicina (Km)	100	100 ^a 500 ^b
Estreptomicina (Sm)	80	80 ^{a,b,c}
Cloranfenicol (Cm)	30	30 ^a
Tetraciclina (Tc)	10	10 ^{a,b}
Ácido Nalidíxico (Nal)	10	5 ^b , 10 ^c

a: *E. coli*; b: *H. seropedicae*; c: *A. brasilense*

As soluções estoques dos antibióticos foram preparadas segundo SAMBROOK *et al.* (1989) e mantidas a -20°C. Os antibióticos foram adicionados ao meio de cultura imediatamente antes do uso.

3.3 PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

A purificação do DNA plasmidial das estirpes de *E. coli* baseou-se no método de lise alcalina segundo SAMBROOK *et al.* (1989).

A estirpe bacteriana contendo o plasmídeo de interesse foi cultivada em 5 mL de meio LB adicionado do(s) antibiótico(s) adequado(s) até D.O.₆₀₀ \cong 2,0. Três mL da cultura foram centrifugados a 13000 rpm por 1 minuto. O sedimento foi ressuspenso em 200 μ L de tampão GET (25 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0; 50 mmol/L de Glucose e 10 mmol/L de EDTA pH 8,0). A lise celular foi obtida pela adição de 200 μ L da solução de lise (SDS 1% e NaOH 0,2 mol/L) preparada no momento do uso. As proteínas, o DNA cromossomal, os restos celulares e o SDS foram precipitados com a adição de 200 μ L de acetato de potássio/ácido fórmico (Kacf) 3 mol/L pH 4,8. Após a homogeneização a mistura foi mantida durante 15 minutos em gelo. Após este período a mistura foi centrifugada a 13000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante contendo o DNA plasmidial foi incubado com 5 μ L de RNase (1 mg/mL) a 37°C por 2 horas. A solução aquosa foi extraída uma vez com 200 μ L de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugado a 13000 rpm por 6 minutos. O DNA plasmidial foi precipitado com 300 μ L de isopropanol (a mistura foi mantida por 30 minutos a temperatura ambiente), centrifugada a 13000 rpm por 15 minutos e lavado com 1 mL de etanol 80% duas vezes, seco em estufa a 37°C e dissolvido em 30 μ L de água.

3.4 DIGESTÃO DO DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Para a digestão do DNA com enzimas de restrição foram utilizadas as condições estabelecidas pelo fabricante. O material (DNA plasmidial ou produto de PCR) foi digerido com as enzimas de restrição apropriadas. Quando o DNA digerido era para utilização em clonagens, após a restrição, as enzimas eram inativadas por calor (20 minutos na temperatura indicada pelo fabricante) e o DNA precipitado com 300 μ L de etanol absoluto por 1 hora, lavado com 1 mL de etanol 80%, seco e dissolvido em 10 μ L de água (SAMBROOK *et al.*, 1989).

3.5 LIGAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA AOS VETORES

Os vetores utilizados nas clonagens foram submetidos à clivagem com as enzimas de restrição adequadas. Após a restrição, quando necessário, foi adicionado ao sistema uma unidade de fosfatase alcalina de camarão (SAP) com a finalidade de defosforilar a extremidade 5' do vetor. A mistura foi incubada a 37°C por 2 horas e a enzima foi inativada por calor (20 minutos a 65°C). O DNA foi purificado como descrito no item 3.4. Os fragmentos de DNA foram ligados numa proporção vol/vol de 10:1 (fragmento:vetor), à mistura foram adicionados tampão de ligação 1x (Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,6; MgCl₂ 10mmol/L; DTT 1mmol/L; ATP 0,5mmol/L; e PEG 8000 5%), 1 U de T4 DNA ligase e água ultra pura estéril, num volume final de 20 µL. A reação foi incubada a 16°C por 18 horas. Em seguida, 1µL do sistema de ligação foi usado para transformação bacteriana (3.7).

3.6 ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE DNA

As eletroforeses de DNA foram realizadas em géis de agarose horizontal conforme descrito por SAMBROOK *et al.* (1989). Os géis de agarose foram preparados em tampão TBE 1X (Tris-borato 45 mmol/L e EDTA 1mmol/L pH 8,0), nas concentrações de 1% e 1,5% (m/v) e a corrida eletroforética foi realizada no mesmo tampão, entre 40 a 60 V durante tempo variável. O DNA foi corado com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta em transiluminador – UVP BioImaging Systems (UVP Inc. Upland, CA USA) e o perfil eletroforético foi registrado em um sistema de vídeo documentação.

3.6.1 Purificação de DNA através de eletroforese em gel de Agarose de Baixo Ponto de Fusão

Em algumas etapas do trabalho, o DNA de interesse digerido(3.4) ou produto de PCR (3.10), foi purificado por eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão (“Low Melting Point” agarose – LMP) na concentração de 0,8% ou 1,5% e preparado em tampão TAE 1X (Tris-acetato 40 mmol/L e EDTA 1mmol/L pH 8,0).

Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com azul de metileno 0,25% ou brometo de etídeo. A banda contendo o fragmento de DNA desejado, foi cortada e transferida para um tubo plástico de 1,5 mL, aquecida a 65°C para provocar a fusão do gel, e ao sistema foi adicionado tampão 100 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1mM de EDTA, 250 mM de NaCl e 1 volume (em relação ao volume de gel fundido) de fenol equilibrado pH 8,0. A mistura foi homogeneizada vigorosamente e centrifugada a 13000 rpm durante 10 minutos. A fase aquosa foi coletada e a esta foi adicionado 1 volume de isopropanol, o que foi seguido de centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado com 1mL de etanol 80%. Após a secagem, o precipitado resultante foi dissolvido em 10 µL de H₂O ultrapura estéril. Alternativamente, o DNA foi purificado utilizando o kit “QIAquick Gel Extraction Kit (250)” da QIAGEN.

3.7 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO

3.7.1 Preparo de células de *E. coli* eletrocompetentes

Cinquenta mililitros de meio SOB (3.2), foram inoculados com 500 µL de uma cultura saturada da estirpe de *E. coli* de interesse (tabela 1), crescida em meio LB “overnight” e incubados a 37°C sob agitação a 120 rpm até atingir uma D.O._{600nm} entre 0,5 e 0,8. A cultura foi resfriada em banho de gelo por 30 minutos. As células foram coletadas por centrifugação a 5000 rpm a 4°C por 5 minutos e lavadas duas vezes com 40 mL de água ultra pura estéril gelada e uma vez com 20mL de glicerol 15% gelado. As células foram ressuspensas em 150µL de glicerol 15% e o volume dividido em alíquotas de 30µL conservadas a - 70°C.

3.7.2 Eletroporação

A transformação por eletroporação de estirpes de *E. coli* foi realizada conforme recomendado pelo fabricante do Cell Porator (BRL-Invitrogen Inc).

Para transformação bacteriana nas estirpes de *E. coli*, 1µL da mistura de ligação ou 50 ng de plasmídeo íntegro a serem eletroporados foram adicionados a

30µL da suspensão de células eletrocompetentes e a mistura foi incubada em gelo por 1 minuto. As células foram transferidas para uma cubeta de eletroporação e submetidas a um campo elétrico (4KΩ, 330µF). As células ressuspensas em 1 mL de meio SOC por 1 hora a 37°C sob agitação a 120 rpm para recuperação. Após este período foram inoculadas em meio LA com o(s) antibiótico(s) adequado(s) e incubadas a 37°C por cerca de 18 horas.

3.8 CONJUGAÇÃO

Os plasmídeos a serem transferidos para as estirpes de *H. seropedicae* e *A. brasilense* por conjugação foram transformados na estirpe de *E. coli* S17.1 (*tra*⁺). As estirpes de *H. seropedicae* ou *A. brasilense* (receptoras) e *E. coli* (doadora) foram cultivadas nos meios NFbHP-malato/lactato (acrescido de 20 mmol/L de NH₄Cl) e LB respectivamente, na ausência de antibióticos, até uma D.O.₆₀₀ de aproximadamente 0,7. Em seguida, 100 µL da cultura de *H. seropedicae* ou *A. brasilense* e 10 µL da cultura de *E. coli* foram misturados em meio LA/NFbHPN-malato/lactato e incubadas a 30°C durante cerca de 20 horas. A massa de células foi raspada, suspensa em 1 mL de NFb-malato/lactato e plaqueada em meio NFbHP-malato/lactato acrescido de 20 mmol/L de NH₄Cl, contendo os antibióticos adequados e incubada a 30°C por, em média, 48 a 72 horas. Após este período, 3 a 5 colônias foram selecionadas, crescidas em meio NFbHPN-malato e mantidas em glicerol 50% e NFbHPN-malato/lactato semi-sólido para realização dos ensaios fisiológicos.

3.9 LIGAÇÃO DO DOMÍNIO N-TERMINAL MUTAGENIZADO COM O DOMÍNIO CENTRAL+C-TERMINAL DA PROTEÍNA NIFA DE *H. seropedicae*

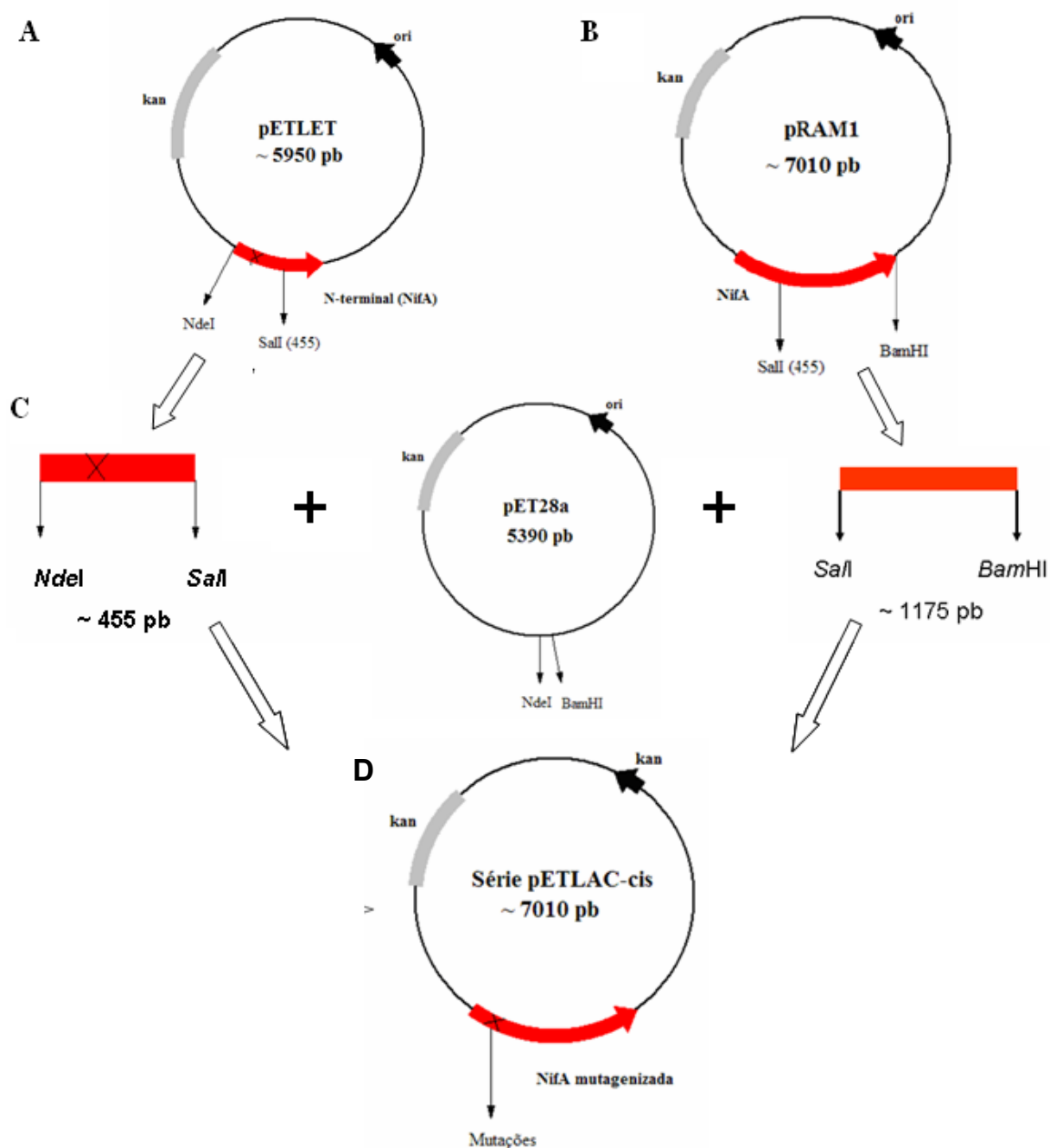
3.9.1 Restrição dos plasmídeos pETLET-Y18F, pETLET-L52Q, pETLET-4.2 (tetra mutante) e pRAM1 e construção dos plasmídeos da série pETLAC-cis

Os plasmídeos pETLET-Y18F, pETLET-L52Q, pETLET-4.2 contêm a sequência codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA, mutagenizado em diferentes posições (tabela 2). Uma estratégia para construir uma proteína NifA

inteira contendo somente estas mutações no domínio N-terminal, seria unir cada um destes domínios mutagenizados aos domínios Central+C-terminal de uma proteína NifA selvagem. Para isso, os plasmídeos citados foram digeridos com as enzimas *NdeI*, *BamHI* e *SaI* conforme indicado na figura 8. Os plasmídeos da série pETLET foram clivados com as enzimas *NdeI*-*SaI*, liberando um fragmento de aproximadamente 455 pb correspondente ao domínio N-terminal com a(s) mutação(s) desejada(s) e o plasmídeo pRAM1, que contém a sequência codificadora da proteína NifA inteira selvagem, foi clivado com as enzimas *SaI*-*BamHI*, liberando um fragmento de aproximadamente 1175 pb da sequência correspondente aos domínios Central+C-terminal (figura 8A e B). Os fragmentos foram purificados por agarose de baixo ponto de fusão 0,8% ou 1,5% (3.6.1) e ligados ao vetor pET28a (Anexo 9) previamente digerido com as enzimas *NdeI*-*BamHI* (3.4) numa proporção de 5:5:1 (fragmento A:fragmentoB:vetor pET28a) (figura 8C).

Após transformação das ligações na estirpe de *E. coli* TOP10 e crescimento em meio sólido LA contendo canamicina, algumas colônias foram selecionadas para obtenção dos clones e o DNA plasmidial foi extraído. Os plasmídeos obtidos continham o gene *nifA* inteiro com as mutações específicas na região do domínio N-terminal e os clones passaram a compor a série pETLAC-cis (figura 8D).

FIGURA 8 - ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DA SÉRIE pETLAC-cis



A) Restrição dos plasmídeos da série pETLET (pETLETY18F, pETLETL52Q e pETLET4.2) **B)** Restrição do plasmídeo pRAM1 **C)** Ligação dos insertos obtidos em A e B com o vetor pET28a digerido com as enzimas *NdeI*-*Bam*HI **D)** Originando o plasmídeo contendo o gene *nifA* mutagenizado na região correspondente ao domínio N-terminal - Série pETLAC-cis. *SalI* (455) = ponto onde a enzima *SalI* corta a *NifA*.

3.10 MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA DA REGIÃO N-TERMINAL DA PROTEÍNA NIFA

Em virtude da dificuldade de obtenção das proteínas NifA mutagenizadas através da ligação dos domínios N-terminal mutagenizado com os domínios central+C-terminal selvagem, paralelamente a esta estratégia algumas das substituições foram obtidas através de mutagênese sítio-dirigida de *nifA*. O método da mutagênese sítio-dirigida foi utilizado para substituir os seguintes aminoácidos do domínio N-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae*: tirosina da posição 18, leucina da posição 52, isoleucina da posição 96 e arginina da posição 157. Para a realização da mutagênese nos nucleotídeos específicos, três amplificações por PCR em seqüência foram utilizadas. As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores estão apresentadas na tabela 4. Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela empresa INVITROGEN Inc.

Os sítios de restrição para diferentes enzimas presentes nos iniciadores HsnifA1 e HsnifA2A (MONTEIRO *et al.*, 1999a) permitiram a clonagem posterior destes fragmentos de DNA no vetor pET28a (Anexo 9). Para as reações de mutagênese sítio-dirigida foi utilizado como molde o plasmídeo pRAM1 (tabela 2), os “primers” HsnifA1, HsnifA2A e um dos oito primers mutagênicos (tabela 4). Para cada reação de mutagênese, três reações de PCR foram realizadas (figura 9):

- Na primeira e na segunda reações foram utilizados os “primers” mutagênicos NifAMut-R + HsNifA1 e NifAMut-U + HsNifA2 e o plasmídeo pRAM1 como molde.

Os fragmentos de DNA resultantes da primeira e segunda reação de PCR foram purificados por “LMP - agarose” 0,8% ou 1,5% (3.6.1). Os DNAs foram utilizados como molde para a terceira reação de PCR.

- Na terceira reação foram utilizados os “primers” HsNifA1 e HsNifA2 e os produtos de amplificação obtidos na primeira e segunda reação de PCR como molde, na proporção de 1:1, para obter a seqüência inteira do gene *nifA*.

O fragmento de DNA resultante da terceira reação foi purificado por “LMP agarose” 0,8%, submetido a restrição com as enzimas *NdeI* e *BamHI* e posteriormente ligado ao vetor pET28a.

TABELA 4 - OLIGONUCLEOTÍDEOS EMPREGADOS PARA MUTAGENIZAR O DOMÍNIO N-TERMINAL DA PROTEÍNA NIFA DE *H. seropedicae*.

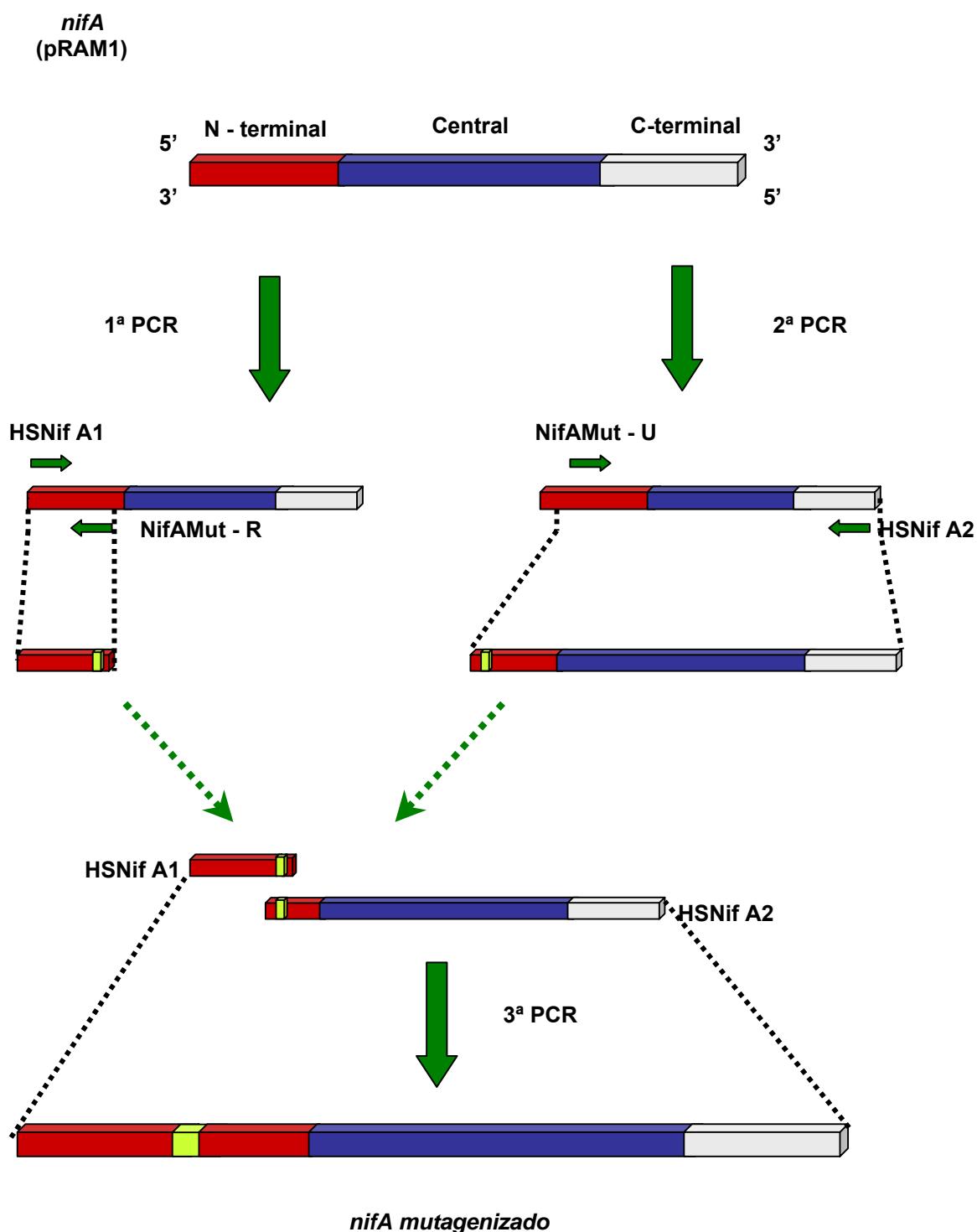
Primers	Característica	Seqüência de nucleotídeo
HsnifA1	Alinha com a extremidade 5' da seqüência do domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> , inserindo sítios de restrição <i>Bam</i> HI e <i>Nde</i> I	5' TAGGGATCCCATATGCCACT 3'
HsnifA2	Alinha com a extremidade 3' da seqüência do domínio C-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> , inserindo sítio de restrição <i>Bam</i> HI	5' AGAGGATCCGTGACAACTTC 3'
NifAMutI96V-U (Este trabalho)	Alinha com a seqüência do domínio N-terminal de <i>H. seropedicae</i> no sentido 5', inserindo um códon mutagênico que permite a troca do aminoácido Isoleucina por Valina na posição 96 da proteína	5' GAAACTCCCCTCGTGGTGCGC 3'
NifAMutI96V-R (Este trabalho)	Alinha com a seqüência do domínio N-terminal de <i>H. seropedicae</i> no sentido 3', inserindo um códon mutagênico que permite a troca do aminoácido Isoleucina por Valina na posição 96 da proteína	5' GCGCACACGAGGGGAGTTTC 3'
NifAMutR157H-U (Este trabalho)	Alinha com a seqüência do domínio N-terminal de <i>H. seropedicae</i> no sentido 5', inserindo um códon mutagênico que permite a troca do aminoácido Arginina por Histidina na posição 157 da proteína	5' GAGGTGCACTGCTGACCATG 3'
NifAMutR157H-R (Este trabalho)	Alinha com a seqüência do domínio N-terminal de <i>H. seropedicae</i> no sentido 3', inserindo um códon mutagênico que permite a troca do aminoácido Arginina por Histidina na posição 157 da proteína	5' CATGGTCAGCAGGTGCACCTC3'
NifAMutY18F-U (ETTO, 2006)	Alinha com a seqüência do domínio N-terminal de <i>H. seropedicae</i> no sentido 3', inserindo um códon mutagênico que permite a troca do aminoácido tirosina por fenilalanina na posição 18 da proteína	5' TTAGAGCTCGTAACGATTTCGAGATC 3'
NifAMutY18F-R (ETTO, 2006)	Alinha com a seqüência do domínio N-terminal de <i>H. seropedicae</i> no sentido 5', inserindo um códon mutagênico que permite a troca do aminoácido tirosina por fenilalanina na posição 18 da proteína	5' GATCTCGAAAATCGTTACGAGCTCTAA 3'
NifAMutL52Q-U (ETTO, 2006)	Alinha com a seqüência do domínio N-terminal de <i>H. seropedicae</i> no sentido 3', inserindo um códon mutagênico que permite a troca do aminoácido leucina por glutamina na posição 52 da proteína	5' CGGGTATTGCAGAGTCTGATGCAGG3'
NifAMutL52Q-R (ETTO, 2006)	Alinha com a seqüência do domínio N-terminal de <i>H. seropedicae</i> no sentido 5', inserindo um códon mutagênico que permite a troca do aminoácido leucina por glutamina na posição 52 da proteína	5' CCTGCATCAGACTCGCAATACCCG 3'

* vermelho: sítio de restrição para a endonuclease *Bam*HI

* azul: sítio de restrição para a endonuclease *Nde*I

* verde: nucleotídeo trocado

FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PCR MUTAGÊNICA



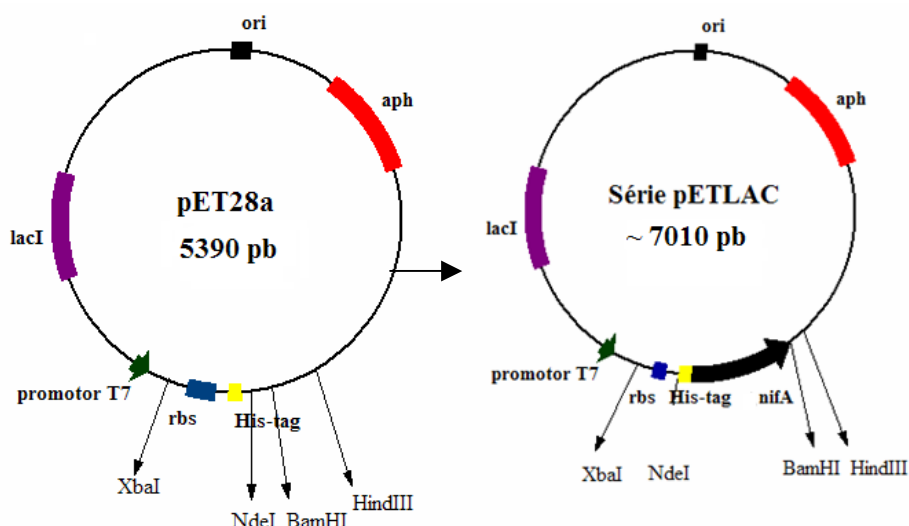
Os “primers” HsnifA1 em conjunto com NifAMut-R e, HsnifA2 em conjunto com NifAMut-U produzem, por reações de PCR, fragmentos com a mutação pontual desejada e estes fragmentos são unidos em uma 3ª PCR utilizando os “primers” HsnifA1 e HsnifA2 em conjunto, sem a necessidade de pRAM1 como molde.

As reações de amplificação foram realizadas segundo MONTEIRO (2001) em volume final de 50 μ L contendo 1 μ L de DNA (500 ng) , 0,3 μ L da mistura 1:10 *Pfu* Turbo (Stratagene): *Taq* DNA Polimerase Platinum (Invitrogen Inc.), 5 μ L do tampão 10X concentrado, 1,5 μ L de $MgCl_2$ 50mM, 2 μ L de dNTP 5 mM (Eppendorf), 1 μ L de cada um dos iniciadores na concentração de 10 pmol/L. As condições de amplificação foram: 1 ciclo de 94°C por 5 minutos e 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 40°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguidas de 1 ciclo a 72°C por 10 minutos. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf AG).

3.11 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DA SÉRIE pETLAC

Os DNA-insertos produzidos por mutagênese sítio-dirigida (3.10) foram digeridos com as enzimas *NdeI*-*Bam*HI e ligados no vetor de expressão pET28a (figura 10) previamente digerido com as mesmas enzimas. O produto de ligação foi utilizado para transformação de *E. coli* TOP10 e os transformantes selecionados em meio LA contendo canamicina. A clonagem foi confirmada pela análise do perfil eletroforético do DNA plasmidial, isolado das colônias transformantes, clivado com as enzimas *NdeI* e *Bam*HI. Os clones selecionados foram seqüenciados, utilizando os “primers” descritos na tabela 5, com a finalidade de se identificar aqueles que continham as mutações pontuais desejadas. Esta série de clones produzida por PCR mutagênica foi denominada pETLAC (tabela 2) e expressam as proteínas NifA mutagenizadas com seus domínios N-terminal fusionados a uma seqüência de seis resíduos de histidinas (His-tag) e sob controle do sítio de ligação de ribossomo (RBS) e sob controle transcricional do promotor pT7 (figura 10).

FIGURA 10 - ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DA SÉRIE pETLAC



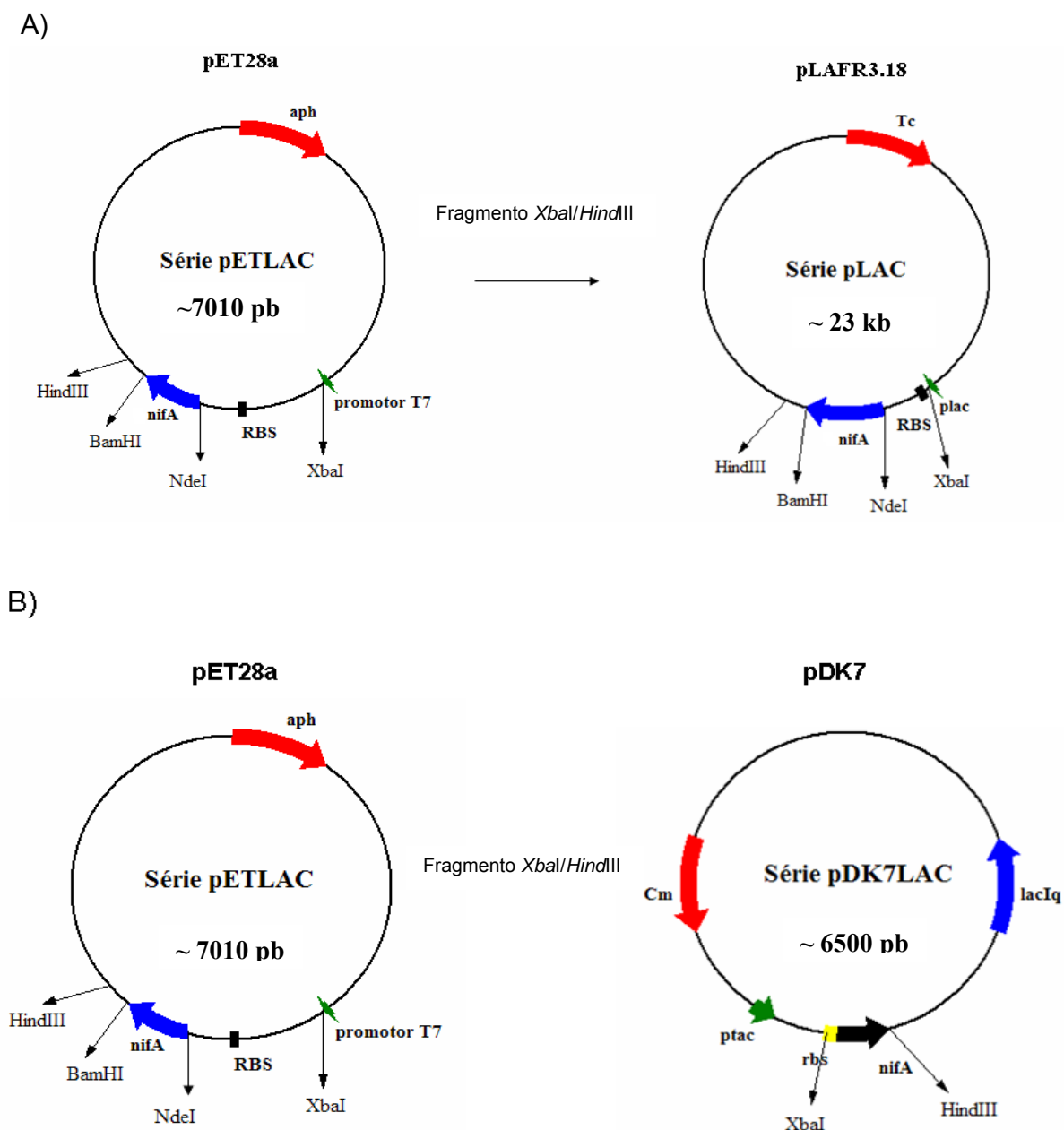
Clonagem no vetor pET28a. Um fragmento *NdeI/BamHI* contendo a região codificadora do gene *nifA* mutagenizado, foi ligado ao vetor pET28a digerido com as mesmas enzimas gerando os plasmídeos da série pETLAC.

3.12 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DAS SÉRIES pLAC e pDKLAC

Os plasmídeos das séries pETLAC e pETLAC-cis foram digeridos com as enzimas de restrição *XbaI-HindIII* e os fragmentos de aproximadamente 1700 pares de base, correspondentes ao gene *nifA*, foram purificados por “LMP - agarose” e ligados nos vetores pLAFR3.18 e pDK7 (figura 11) digeridos com as mesmas enzimas. O produto de ligação foi utilizado para transformação de *E. coli* TOP10 e os transformantes selecionados em meio LA contendo tetraciclina e cloranfenicol, respectivamente. A clonagem foi confirmada pela análise do perfil eletroforético do DNA plasmidial e os clones resultantes passaram a compor as séries pLAC e pDKLAC (tabela 2) e expressam as proteínas NifA mutagenizadas fusionadas a sequência de histidinas (His-tag – trazida do vetor pET28a), sob controle do sítio de

ligação de ribossomo (RBS) do plasmídeo pET28a e sob controle transcricional dos promotores *plac* e *ptac* respectivamente (figura 11).

FIGURA 11 - ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DA SÉRIE pLAC E pDKLAC

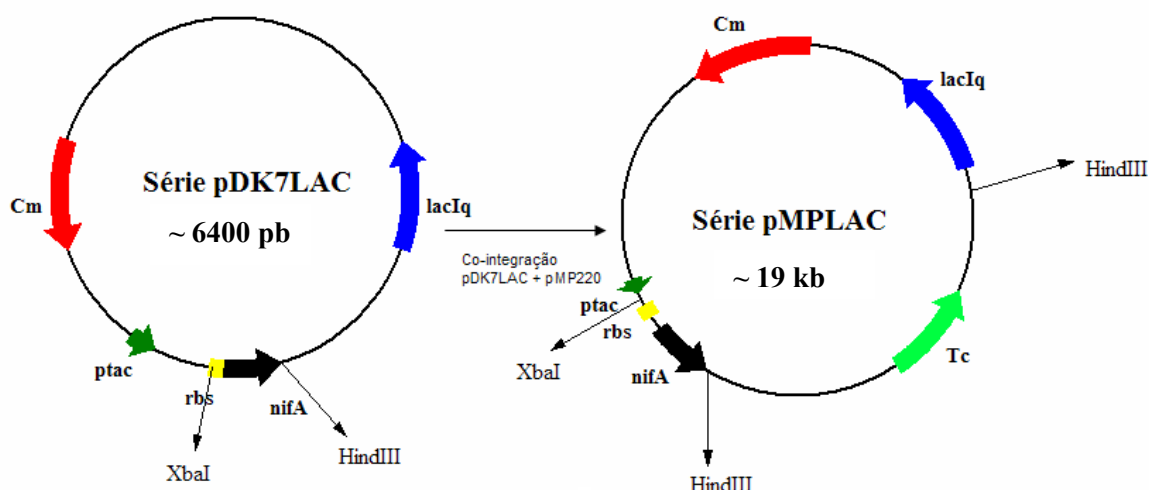


Clonagem nos vetores pLAFR3.18 e pDK7. Um fragmento *XbaI/HindIII* contendo a região codificadora do gene *nifA* mutagenizado, foi ligado aos vetores pLAFR3.18 (A) e pDK7 (B) gerando os plasmídeos da série pLAC e pDKLAC, respectivamente.

3.13 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DA SÉRIE pMPLAC

Os plasmídeos da série pDKLAC foram submetidos a restrição com a enzima *Hind*III e ligados ao plasmídeo pMP220 digerido com a mesma enzima, originando os plasmídeos da série pMPLAC. Estes plasmídeos foram utilizados para expressar as proteínas NifA-His mutagenizadas em *H. seropedicae* sob controle transcricional do promotor *ptac* e sujeitos a regulação pelos níveis de IPTG no meio (figura 12).

FIGURA 12 - ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DA SÉRIE pMPLAC



Os plasmídeos da série pDKLAC e pMP220 foram co-integrados através do sítio *Hind*III, gerando os plasmídeos da série pMPLAC.

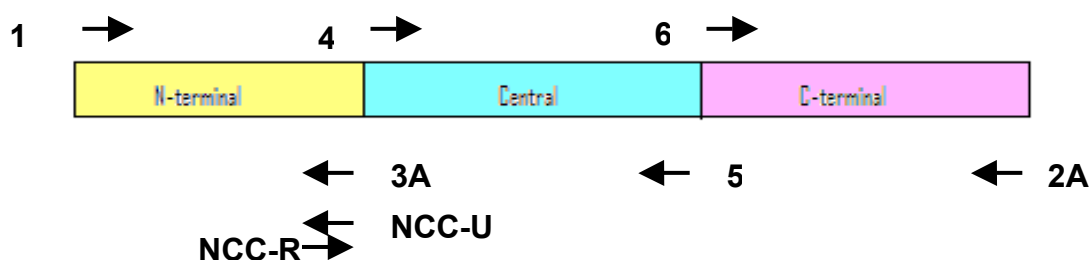
3.14 SEQUENCIAMENTO DE DNA

Os fragmentos de DNA, contendo o gene *nifA* mutagenizado e clonados no vetor pET28a foram seqüenciados com os “primers” universal e reverso deste vetor (INVITROGEN Inc.) e com os “primers” HsNifA1, HsNifA2A, HsNifA3A, HsNifA4, HsNifA5, HsNifA6 (MONTEIRO *et al.*, 1999a; MONTEIRO *et al.*, 1999b; MONTEIRO,

2001), NCC-universal e NCC-reverso (este trabalho), para averiguar a integridade do fragmento e a presença das mutações desejadas. As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão descritas na tabela 5.

TABELA 5 - OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO.

“PRIMER”	SEQUÊNCIA
Universal – pET28a	5' GACGTTGTAAAACGACGGCC 3'
Reverso – pET28a	5' TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC 3'
HsNifA1: N-terminal, sentido 5'.	5' TAGGGATCCCATATGGCCACT 3'
HsNifA2A: C-terminal, sentido 3'	5' AGAGATCCTAGAACTTCTTGACCTCG 3'
HsnifA3A: Central - N-terminal, sentido 3'	5' ATGGATCCTGACTTATCGAG 3'
HsnifA4: N-terminal - Central, sentido 5'.	5' TCGGATCCGTAATCGGC 3'
HsNifA5: C-terminal - Central, sentido 3'.	5' CGGGATCCTCAGGAGGTCCG 3'
HsnifA6: C-terminal, sentido 5'	5' CGGGATCCGAACGCGAA 3'
N/CC-Universal	5' AAGCTCGATAACGTAATCGGC3'
N/CC-Reverso	5' GCCGATTACGTTATCGAGCTT3'



3.14.1 Reação de sequenciamento

O sequenciamento de DNA foi realizado pelo método de terminação de cadeia utilizando dideoxirribonucleotídeos (SANGER *et al.*, 1977). Neste sistema dideoxinucleotídeos fluorescentes são utilizados como terminadores de cadeia, seguido de eletroforese em gel de poliacrilamida e detecção a laser. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando aproximadamente 0,5 µg de DNA purificado, 10 pmol/L do oligonucleotídeo iniciador apropriado e 3,0 µL da mistura para sequenciamento Sequencing Reagent Premix (DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Amersham Biosciences), o volume final de reação foi de 7,5 µL. Os parâmetros de amplificação foram definidos de acordo com os iniciadores utilizados. Para os “primers” universal e reverso do vetor pET28a, HsNifA1, HsNifA2A, HsNifA3A, NCC-U e NCC-R, o programa utilizado foi o seguinte: 1 ciclo de 95°C por 1 minuto e 34 ciclos de 94°C por 20 segundos e 60°C por 2 minutos; e para os “primers” HsNifA4, HsNifA5 e HsNifA6 foi: 1 ciclo de 95°C por 1 minuto e 34 ciclos de 94°C por 20 segundos e 50°C por 1 minuto e 60°C por 2 minutos. Como moldes para as reações de sequenciamento foram utilizados plasmídeos da série pETLAC purificados conforme item 3.3.

O produto da reação de seqüenciamento foi transferido para um tubo plástico de 500 µL, sendo então acrescentados 12,5 µL de água ultra pura estéril, 2 µL de acetato de amônio 7,5 mmol/L e 60 µL de etanol 96%. Essa mistura foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. Após centrifugação por 15 minutos a 13.000 rpm, o precipitado foi lavado com 150 µL de etanol 80%, seco a temperatura ambiente. O DNA purificado, utilizado para reação de sequenciamento, foi dissolvido em 4 µL de Formamide Loading Dye (Applied Biosystems) e submetido a eletroforese no seqüenciador ABI-PRISM 377 (Applied Biosystems).

As seqüências de nucleotídeos obtidas foram analisadas utilizando os programas BLAST (GeneBank/NCBI) (ALTSCHUL *et al.*, 1997), Clustal W (THOMPSON, HIGGINS, GIBSON ., 1994) e o BioEdit (HALL, 1999).

3.15 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS (SDS-PAGE)

As proteínas foram analisadas por eletroforese em géis de poliacrilamida sob condições desnaturantes, conforme o descrito por Laemli (1970). As concentrações de géis utilizadas foram de 8 e 12%, uma vez que as proteínas analisadas possuem massa molecular acima de 20 kDa (a massa molecular aproximada da proteína NifA de *H. seropedicae* é de 62 kDa).

Os volumes das soluções utilizadas para os géis de corrida e de empilhamento estão descritos na tabela 6.

TABELA 6 - SOLUÇÕES E VOLUMES PARA O PREPARO DOS GÉIS DE CORRIDA E EMPILHAMENTO NAS CONCENTRAÇÕES DESCRITAS.

Soluções	Gel de corrida (2 géis)		Gel de empilhamento
Concentração	8%	12%	
Acrilamida 30%	2,5 mL	3 mL	450 µL
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	2,5 mL	2,5 mL	-
Tris-HCl 0,5M pH 6,8	-	-	1 mL
SDS 10%	300 µL	300 µL	240 µL
Persulfato de Amônio 10%	100 µL	100 µL	50 µL
TEMED	10 µL	10 µL	4 µL
Água destilada	5 mL	4,5 mL	2,5 mL

As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical seguindo recomendação do fabricante (Biorad). As corridas foram realizadas a 150-180 V em tampão de corrida 1 X (3g Tris-base, 14g Glicina e 1g SDS por litro) por 1 hora. Após a corrida os géis foram corados com Comassie Blue para verificar a expressão ou as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose.

3.16 EXPRESSÃO DAS FORMAS SELVAGEM E MUTAGENIZADAS DA PROTEÍNA NIFA DE *H. seropedicae* A PARTIR DOS PROMOTORES *pT7* e *ptac*

Cem microlitros de culturas saturadas de *E. coli* estirpes BL21 (λ DE3) pLysS ou YMC 10, contendo os plasmídeos de expressão construídos (série pETLAC ou pETLAC-cis e pDKLAC respectivamente), foram inoculados em dez mililitros de meio LB e incubados a 37°C sob agitação de 120 rpm até atingir D.O._{600nm} de aproximadamente 0,5. Foi então adicionado à cultura 1 mmol/L de IPTG e mantidas as mesmas condições de incubação por mais por 3 horas. Após este período a cultura foi centrifugada a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C, o meio foi descartado e o sedimento celular foi ressuspensão em 400µL de solução de sonicação (500 mmol/L NaCl e 50 mmol/L Tris-HCl pH 8,0). As células foram lisadas utilizando o Sonicador Heat System e mantidas em gelo durante toda a etapa de lise. O lisado foi separado em fração solúvel e insolúvel, por centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos. As proteínas foram analisadas por eletroforese de poliacrilamida em condição desnaturante e cerca de 10 a 30 µg de proteínas foram utilizados nos ensaios de expressão.

3.17 IMUNODETECÇÃO DAS FORMAS SELVAGEM E MUTAGENIZADAS DA PROTEÍNA NIFA DE *H. seropedicae* A PARTIR DO PROMOTOR *plac*

Para imunodeteção das proteínas NifA mutagenizadas e expressas a partir do promotor *lac*, 4 mL de culturas da estirpe de *E. coli* YMC 10 (contendo plasmídeos das séries pLAC) crescidas em meio LB acrescido de IPTG (1 mmol/L), foram concentrados com a resina Talon[®] (Talon[®] Metal Affinity Resin – Clontech). Para isso, a cultura, crescida “overnight” (D.O. ~ 2.0), foi centrifugada a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C, o meio foi descartado e o sedimento celular foi ressuspensão em 400µL de Tampão de Sonicação (500mmol/L NaCl e 50 mmol/L Tris-HCl pH 8,0) acrescido de 0,5% de Sarcosil. As células foram lisadas utilizando o Sonicador Heat System mantendo-se as células em gelo durante toda etapa de lise. O lisado celular foi separado em fração solúvel e insolúvel por centrifugação a 13000 rpm por 10

minutos e à fração solúvel foram misturados 100 μ L da resina previamente equilibrada. A mistura foi cuidadosamente homogeneizada por 5 minutos e a resina foi separada do lisado celular por decantação. A resina foi lavada 1X com Tampão de Sonicação + Sarcosil 0,5% por 1 minuto e 3X com o mesmo tampão acrescido de Imidazol 25 mmol/L. Após as lavagens a resina foi misturada com 50 μ L de tampão de amostra (2% de SDS, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, 0,0625 mol/L de Tris-HCl pH 6,8 e 5% de β -mercaptoetanol) e fervida por cinco minutos. As proteínas foram aplicadas em gel de poliacrilamida 8% em condição desnaturante. Para imunodeteccção de proteínas expressas a partir do promotor *lac* (plasmídeos da série pLAC).

As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical seguindo recomendação do fabricante (Biorad). As corridas foram realizadas a 130-150 V em tampão de corrida 1 X (3g Tris-base, 14g Glicina e 1g SDS por litro) por 1 hora. As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond ECL – GE Healthcare) utilizando um sistema de transferência semi-seco.

3.17.1 Transferência

Para o processo de transferência foram requeridos 3 tampões, descritos na tabela 7.

TABELA 7: TAMPÕES DE TRANSFERÊNCIA

Tampões Componentes	Ânodo 1 (A1)	Ânodo 2 (A2)	Catodo (C)
Tris 0,5M pH 10	150 mL	12,5 mL	12,5 mL
Ácido Capróico 0,4M	-	-	25 mL
Metanol	50 mL	50 mL	50 mL
Água destilada	50 mL	187,5 mL	162,5 mL

Antes de iniciar a transferência, a placa de ânodo foi coberta com 2 camadas de papel filtro previamente imersa em tampão A1, seguido de uma camada de papel filtro contendo tampão A2. A membrana de nitrocelulose foi ativada por 30 segundos em metanol, imersa em tampão A2 e colocada sobre as 3 camadas de papel filtro. O gel foi colocado sobre a membrana e mais 3 camadas de papel filtro imersos em tampão C foram então colocados sobre este, sempre tomando o cuidado para se evitar bolhas de ar no sistema. Uma pipeta de vidro foi utilizada para comprimir o sistema de transferência e expelir eventuais bolhas de ar. A placa do cátodo foi colocada sobre as folhas de papel filtro, o sistema foi conectado a uma fonte de eletroforese a 80mA por 1 hora. A transferência foi avaliada utilizando um marcador de proteína pré-corado (New England Biolabs).

3.17.2 Tratamento da membrana

Após a transferência, o tratamento da membrana foi realizado em tampão TBS+T (Tris pH 7,6; 2,42g/L; NaCl 8g/L; tween 20 mL/L). Depois da transferência, a membrana foi bloqueada com solução de leite em pó desnatado 5% em TBS+T “overnight” a 4°C. A membrana foi então lavada com TBS+T e incubada sob agitação por 1 hora em solução contendo 10 mL de TBS+T + 1% de leite em pó desnatado e o anticorpo primário. Extratos celulares totais foram adicionados a solução contendo o anticorpo primário, como descrito na tabela 8, para bloquear ligações inespecíficas.

TABELA 8: ANTICORPO PRIMÁRIO E BLOQUEADORES.

ANTICORPO	DILUIÇÃO	AGENTE BLOQUEADOR	FONTE
Anti- α His	1:5000	100 μ g/mL de extrato de células de <i>E. coli</i> BL21 ou YMC	GE HealthCare

Após incubação, a membrana foi lavada 1X com TBST por 15 minutos e 3X por 5 minutos e então incubada com 10 mL de solução contendo o anticorpo secundário (anti IgG de coelho (anti-NifA) ou anti IgG de rato (anti-His) conjugados

com a enzima peroxidase HRP – GE Health care) na diluição de 1:5000 por 1 a 2 horas a temperatura ambiente. Após as 4 etapas de lavagem com TBS+T a membrana foi submetida à revelação utilizando o sistema ECL (GE – Health care) seguindo as recomendações do fabricante. Para a revelação a membrana foi mantida em câmara escura e o resultado foi registrado utilizando uma câmera CCD em um sistema vídeo-imagem acoplado (UVP).

3.18 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Foi utilizado o método de Bradford, baseado na ligação do Coomassie Blue G-250 com a proteína (BRADFORD, 1976). As determinações de proteínas em suspensões de células foram feitas após a lise alcalina em NaOH 0,5 M e incubação por pelo menos uma hora a temperatura ambiente. O sistema de reação continha 170 µL de solução de Bradford (100 mg/L Coomassie Brilliant Blue G250, 95% etanol, 85% ácido fosfórico) e 30 µL de amostra. Essa mistura foi homogeneizada e a absorbância determinada a 595 nm. A curva padrão foi feita utilizando albumina de soro bovino (BSA) como referência.

3.19 ANÁLISE FISIOLÓGICA DAS FORMAS MUTAGENIZADAS DA PROTEÍNA NIFA DE *H. seropedicae*

3.19.1 Capacidade de ativação da transcrição dos genes *nifH* e *nifB* “in vivo”

A capacidade de ativador transcricional das proteínas NifA mutantes foi determinada através da medida da expressão da fusão *nifH*(*K. pneumoniae*):*lacZ* a partir do plasmídeo pRT22 e da fusão *nifB*(*H. seropedicae*):*lacZ* a partir do plasmídeo pEMS140 nas estirpes de *E. coli* JM109 (DE3) e YMC 10 ou a partir da fusão cromossomal *nifH*:*lacZ* em *H. seropedicae* estirpe IM40. Os plasmídeos da série pETLAC ou pETLAC-cis e pDKLAC foram transformados nas estirpes de *E. coli* JM109 (DE3) e YMC 10, respectivamente (3.7), e os plasmídeos da série pLAC e pMPLAC transformados em *H. seropedicae* IM40 (3.8). A atividade de β -galactosidase das estirpes transformadas foi então determinada.

3.19.1.1 Determinação da atividade de β -galactosidase em *E. coli*

A determinação da atividade de β -galactosidase foi realizada segundo Miller (1992). Os plasmídeos contendo *nifA* selvagem, mutantes e N-truncada foram transformados nas estirpes de *E. coli*. Duzentos microlitros de uma cultura fresca da estirpe de *E. coli* crescida em meio LB, foram inoculados em 4 mL de meio NFDM contendo casaminoácido (10 μ g/mL), antibióticos, 1 mmol/L de IPTG e, quando necessário, 20 mmol/L de NH₄Cl e crescidos por 16 horas a 30°C e 120 rpm na ausência de oxigênio, visto que a proteína NifA de *H. seropedicae* é sensível ao O₂ (SOUZA *et al.*, 1999). A D.O._{600nm} no momento do ensaio era de aproximadamente 0,5 a 0,7.

O meio de reação continha: 100 μ L da cultura de células induzidas, 900 μ L de tampão Z (Na₂HPO₄ 60 mmol/L, NaH₂PO₄ 40 mmol/L, KCl 10 mmol/L, MgSO₄ 1mmol/L, β -mercaptoetanol 50mmol/L e SDS 0,1%) e 25 μ L de clorofórmio. Após a homogeneização, a mistura de reação foi incubada a 30°C por 10 minutos. Iniciou-se a reação pela adição de 200 μ L de solução de o-nitrofenil β -D-galactopiranosídeo (ONPG) 4 mg/ml. A reação foi incubada em banho maria a 30°C por 30 minutos e interrompida pela adição de 500 μ L de Na₂CO₃ 1mol/L. Procedeu-se as leituras de absorbância a 420nm (o-nitrofenol), 550nm (interferência da mistura) e 600nm (densidade celular).

Os cálculos de atividade foram feitos utilizando a fórmula abaixo:

$$\text{Atividade de } \beta\text{-galactosidase} = \frac{1000 \times (A_{420\text{nm}} - 1,75 \times A_{550\text{nm}})}{t \times V \times A_{600\text{nm}}}$$

t = tempo de incubação em minutos

V = volume da cultura de células em mL

A nm = Absorbância no comprimento de onda indicado

A atividade de β -galactosidase é expressa em unidades Miller.

3.19.1.2 Determinação da atividade de β -galactosidase em *H. seropedicae*

Para os ensaios de β -galactosidase com *H. seropedicae*, as culturas foram incubadas por 16 horas em meio NFbHPN-malato, sob agitação a 120 rpm. As células foram coletadas por centrifugação, ressuspensas em meio fresco NFbHP em D.O._{600nm} de 0,2 (3 mL de cultura líquida em frasco de 25 mL) e incubadas a 30°C, 120 rpm sob condições de microaerofilia (1,5% de O₂), na presença de 5 mmol/L de glutamato ou 20 mmol/L de NH₄Cl por aproximadamente 7 horas.

O meio de reação continha: 100 μ L da cultura de células induzidas, 900 μ L de tampão Z (Na₂HPO₄ 60 mmol/L, NaH₂PO₄ 40 mmol/L, KCl 10 mmol/L, MgSO₄ 1mmol/L, β -mercaptoetanol 50mmol/L e SDS 0,1%) e 25 μ L de clorofórmio. Após a homogeneização, a mistura de reação foi incubada a 30°C por 10 minutos. Iniciou-se a reação pela adição de 200 μ L de solução de o-nitrofenil β -D-galactopiranosídeo (ONPG) 4 mg/ml. A reação foi incubada em banho maria a 30°C por 40 minutos e interrompida pela adição de 500 μ L de Na₂CO₃ 1mol/L. Procedeu-se as leituras de absorbância a 420nm (o-nitrofenol), 550nm (interferência da mistura) e 600nm (densidade celular). A atividade de β -galactosidase foi reportada como nmol de o-nitrofenol.min⁻¹. mg prot⁻¹.

3.19.2 Determinação da atividade de nitrogenase

Além do N₂, a nitrogenase pode reduzir outros substratos alternativos (REES *et al.*, 2005). A atividade da nitrogenase foi determinada pelo método de redução do acetileno a etileno que é facilmente identificado por cromatografia gasosa (DILWORTH, 1966, SCHOLLHORN & BURRIS, 1967). Tanto o acetileno quanto o etileno são permeáveis ao envelope bacteriano, então a atividade de nitrogenase pode ser medida “in vivo” e “in vitro” pelo método de redução do acetileno (HALBLEIB & LUDDEN, 2000).

Para determinar a atividade de nitrogenase as células de *H. seropedicae* e *A. brasilense* foram crescidas em meio NFbHP-malato/lactato semi-sólido em frascos de 10mL contendo 4mL de meio acrescido de 0,4 de glutamato ou 20 mmol/L de

NH₄Cl como fonte de nitrogênio. Como inóculo foram utilizados 30 a 50µL de uma cultura saturada crescida em meio NFbHP-malato/lactato. Após 16 – 30 horas de crescimento (dependendo do organismo) a 30°C, os frascos foram vedados com rolhas de borracha (subba-seal) e então foi injetado acetileno gasoso (10% do volume da fase gasosa do frasco), a cultura foi incubada nas mesmas condições por 1 hora. Após este período, foi coletada uma amostra de 0,5 mL da fase gasosa para detecção do etileno formado, por cromatografia. Foi utilizado um cromatógrafo gasoso equipado com uma coluna de Porapak N e detector de ionização de chama. A temperatura da coluna foi mantida em 120°C e do detector em 200°C. O gás de arraste foi o nitrogênio. Para o cálculo do etileno formado foi utilizado um padrão de etileno fornecido pela White Martins S.A. A atividade específica da nitrogenase foi expressa como nmol de etileno total formado por minuto por miligrama de proteína total na cultura.

4. RESULTADOS

Para verificar o efeito das mutações obtidas por Etto (2006) no domínio N-terminal da proteína NifA, sobre sua atividade, foram construídos genes que codificam para proteínas NifA íntegras contendo as trocas pontuais da tirosina na posição 18, leucina na posição 52, isoleucina na posição 96 e arginina na posição 157, além do tetra mutante aleatório do domínio N-terminal. Com essas construções foi possível realizar estudos fisiológicos não apenas em sistemas heterólogos, mas em estirpes de *H. seropedicae*.

4.1 OBTENÇÃO DAS FORMAS VARIANTES DE NIFA DE *H. seropedicae*

As variantes NifA contendo as substituições desejadas no domínio N-terminal puderam ser obtidas de duas formas a seguir descritas.

4.1.1 Ligação do domínio N-terminal mutagenizado com o domínio Central+C-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae*

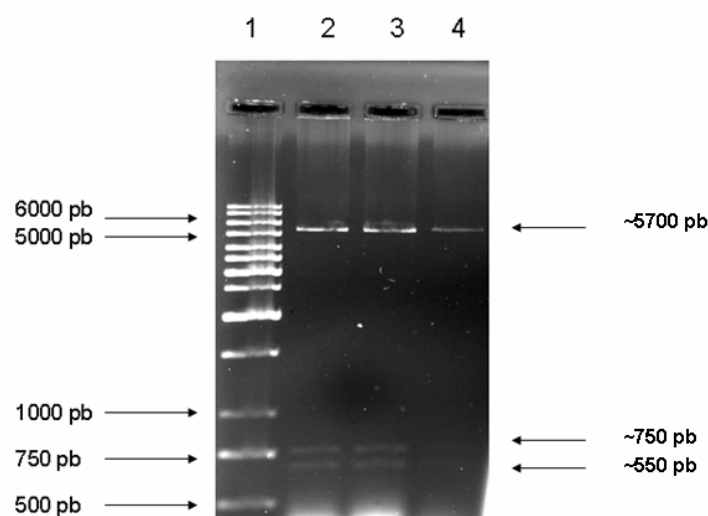
Uma das formas para obtenção dos mutantes Y18F, L52Q e do tetra mutante aleatório de NifA foi a união do domínio N-terminal que continha essas mutações, ou seja, da série pETLET (plasmídeos cedidos por Rafael Mazer Etto) com os domínios Central+C-terminal da NifA selvagem. O resultado final foi a proteína NifA contendo apenas as mutações desejadas no domínio N-terminal. A ausência de mutações extras neste ou nos outros domínios de *nifA* foi confirmada através de seqüenciamento (3.14).

Os fragmentos *NdeI-SalI* (~455 pb) dos plasmídeos da série pETLET e *SalI-BamHI* (~1175 pb) do plasmídeo pRAM1, foram ligados em uma única reação ao vetor pET28a previamente digerido com as enzimas *NdeI* e *BamHI* (3.9.1). A enzima *SalI* digere *nifA* na região de 455 pares de base e desta forma, não foi possível obter o tetra mutante aleatório, visto que, os códons correspondentes à troca R157H localizavam-se na região de 471 pares de base e, portanto, ficaram fora da região *NdeI-SalI* após a restrição. Outras enzimas foram testadas, porém o

tetra mutante aleatório só pôde ser obtido por PCR. O plasmídeo resultante continha então *nifA* com apenas as três primeiras substituições (I96V, E134V e V138E).

Para verificar se a ligação dos fragmentos ocorreu na orientação correta, os plasmídeos obtidos por extração foram digeridos com as enzimas *NdeI* e *BamHI* que liberam o inserto do vetor gerando fragmentos de aproximadamente 1600 e 5300 pares de base respectivamente e também com a enzima *EcoRI*, que gerou fragmentos de aproximadamente 5700, 750 e 550 pares de base (figura 13).

FIGURA 13 - PADRÃO DE BANDAS OBTIDAS APÓS RESTRIÇÃO DOS CLONES DA SÉRIE pETLAC-cis COM *EcoRI*.



Eletoforese em gel de agarose 1% em TBE 1X, corado com brometo de etídeo e imagem registrada em um sistema de vídeo-documentação. **1:** marcador de massa molecular 1kb DNA Ladder ; **2 a 4:** clones da série pETLAC-cis (pETLAC-cis-Y18F, pETLAC-cis-L52Q e pETLAC-cis3) digeridos com a enzima *EcoRI*. O tamanho correspondente das bandas esperadas está à direita.

Estes clones passaram a compor a série de plasmídeos pETLAC-cis (pETLAC-cisY18F, pETLAC-cisL52Q e pETLAC-cis3 – tabela 2) e expressam as proteínas NifA-His mutagenizadas sob controle do promotor *T7* do vetor pET28a.

4.1.2 Mutagênese sítio-dirigida

Em virtude da dificuldade inicial para obtenção de algumas variantes NifA (Y18F, L52Q e tetra mutante) através da estratégia de ligação dos domínios, os mutantes *nifA* também foram construídos por mutagênese sítio-dirigida, baseada em amplificações por PCR com os oligonucleotídeos apropriados, com as trocas nos códons específicos. Os aminoácidos tirosina da posição 18, leucina da posição 52, isoleucina da posição 96 e arginina da posição 157 foram escolhidos para o estudo de mutagênese sítio-dirigida e os códons modificados estão apresentados na tabela 9.

TABELA 9 - CÓDONS ALTERADOS PARA AS REAÇÕES DE MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA

Domínio N-terminal de NifA de <i>H. seropedicae</i>			
Selvagem		Mutante	
Aminoácido	Códon	Aminoácido	Códon
Tirosina (18)	TAC	Fenilalanina	<u>T</u> TC
Leucina (52)	CTG	Glutamina	C <u>A</u> G
Isoleucina (96)	ATC	Valina	<u>G</u> TC
Arginina (157)	CGC	Histidina	C <u>A</u> C

* Entre parênteses estão representadas as posições dos resíduos de aminoácidos selecionados para mutagênese. Em negrito e sublinhado estão marcados os nucleotídeos que foram substituídos em cada códon.

A estratégia utilizada baseou-se na amplificação da seqüência codificadora da proteína NifA utilizando “primers” mutagênicos complementares, apresentados na tabela 4 (3.10). Para cada “primer” mutagênico utilizado havia a seqüência

complementar em outro “primer” no sentido oposto (figura 9) (LING & ROBINSON, 1997).

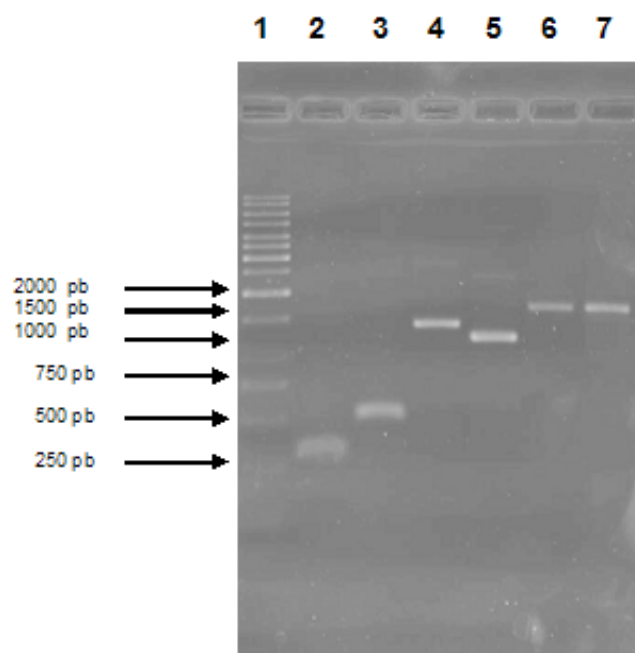
Na primeira amplificação por PCR foram utilizados os “primers” HsnifA1 e um dos “primers” mutagênicos no sentido reverso (NifAMUTY18F-R, NifAMUTL52Q-R, NifAMUTI96V-R ou NifAMUTR157H-R) (tabela 4). Os produtos destas amplificações apresentaram 86, 179, 310 e 491 pares de bases, respectivamente. Na segunda amplificação por PCR foram utilizados os “primers” HsnifA2A e um dos “primers” no sentido universal (NifAMUTY18F-U, NifAMUTL52Q-U, NifAMUTI96V-U ou NifAMUTR157H-U) (tabela 4), gerando produtos de 1592, 1492, 1319 e 1173 pares de bases, respectivamente. Os fragmentos purificados obtidos das duas primeiras PCR's foram unidos em uma terceira PCR e então foi possível obter a sequência do gene *nifA* inteiro com a mutação inserida na região correspondente ao domínio N-terminal, utilizando-se os “primers” HsnifA1 e HsnifA2. Na figura 14 observam-se os fragmentos derivados das três reações de amplificação para obtenção dos mutantes NifA-I96V e NifA-R157H.

O tetra mutante aleatório de *nifA* foi obtido de forma semelhante, nas mesmas três amplificações por PCR (3.10), sendo utilizados os “primers” N/CC Universal e Reverso (abaixo), os “primers” HsNifA1 e HsnifA2 e como molde o plasmídeo pETLET4.2. Os “primers” N/CC Universal e Reverso não inserem mutações extras e são complementares, permitindo assim a correta ligação dos fragmentos da primeira e segunda amplificação por PCR.

N/CC-Universal (Este trabalho)	Alinha com a sequência do domínio N-terminal de <i>H. seropedicae</i> no sentido 5', posição 593 - 614	5' AAGCTCGATAACGTAATCGGC3'
N/CC-Reverso (Este trabalho)	Alinha com a sequência do domínio N-terminal de <i>H. seropedicae</i> no sentido 3', posição 614-593	5' GCCGATTACGTTATCGAGCTT3'

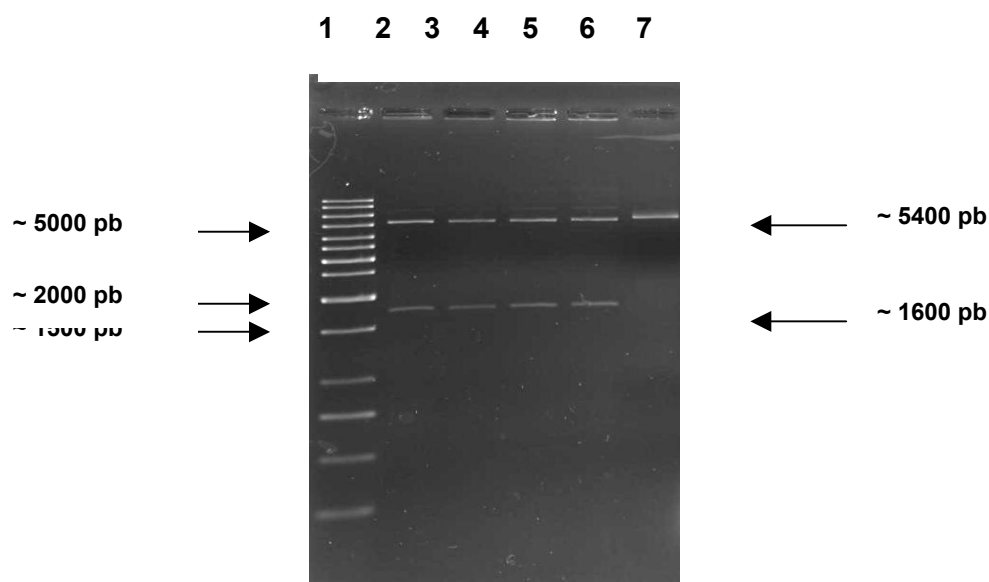
Os fragmentos de DNA obtidos foram ligados ao vetor pET28a, as misturas de ligação foram transformadas e as colônias transformantes selecionadas (3.11). Os clones foram confirmados por digestão com as enzimas *NdeI* e *BamHI* que geram fragmentos de aproximadamente 5400 e 1600 pares de base (figura 15). Estes clones passaram a compor a série de plasmídeos pETLAC (pETLAC-L14P/Y18F, pETLAC-L52Q, pETLAC-I96V, pETLAC-R157H e pETLAC-4 – tabela 2).

FIGURA 14 - PRODUTOS DAS TRÊS AMPLIFICAÇÕES POR PCR PARA MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA



Eletróforese em gel de agarose 1% em TBE 1X, corado com brometo de etídeo com a imagem capturada em um sistema de vídeo-documentação. **1:** padrão de pares de base 1kb DNA Ladder; **2:** produto da reação com o “primer” NifAMutI96V-R (fragmento de 310 pb); **3:** produto da reação com o “primer” NifAMutR157H-R (fragmento de ~ 491 pb); **4:** produto da reação com o “primer” NifAMutI96V-U (fragmento de ~ 1319 pb); **5:** produto da reação com o “primer” NifAMutR157H-U (fragmento de ~ 1173 pb); **6:** produto da reação com os “primers” HsnifA1 e HsnifA2 (fragmento de ~ 1600 pb) correspondente ao gene *nifA* com a mutação I96→V; **7:** produto da reação com os “primers” HsnifA1 e HsnifA2 (fragmento de ~ 1600 pb) correspondente ao gene *nifA* com a mutação R157→H.

FIGURA 15 - PADRÃO DE BANDAS OBTIDAS APÓS RESTRIÇÃO DOS CLONES DA SÉRIE pETLAC



Eletoforese em gel de agarose 1% em TBE 1X, corado com brometo de etídeo com a imagem capturada em um sistema de vídeo-documentação. **1:** marcador de massa molecular 1kb DNA Ladder; **2 a 6:** clones da série pETLAC (pETLAC-L14P/Y18F, pETLAC-L52Q, pETLAC-I96V e pETLAC-R157H) digeridos com as enzimas *NdeI-BamHI*; **7:** pET28a digerido com as enzimas *NdeI-BamHI*. O tamanho correspondente das bandas esperadas está à direita.

Assim como a série pETLAC-cis, os plasmídeos da série pETLAC são capazes de expressar as proteínas NifA-His mutagenizadas em células que contêm a RNA polimerase do fago T7, como por exemplo a estirpe de *E. coli* BL21 (λ DE3) pLysS, uma vez que a expressão destas proteínas está sob controle transcricional do promotor T7, presente no vetor pET28a. Deste modo na presença de um indutor, a T7 RNA polimerase é sintetizada e transcreve com alta eficiência a seqüência de DNA clonada (TABOR & RICHARDSON, 1985).

4.2 SEQUENCIAMENTO

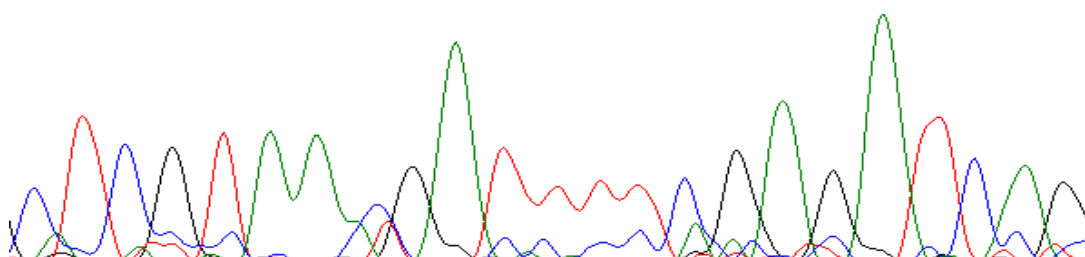
Os clones das séries pETLAC e pETLAC-cis foram seqüenciados para confirmar a presença das mutações desejadas. Após a análise dos cromatogramas, utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999), foi confirmada a presença das mutações desejadas no domínio N-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae* nos clones pETLAC-cisY18F, pETLAC-cisL52Q, pETLAC-cis3 ou triplo mutante (I96V, E134V, V138E), pETLAC-L52Q, pETLAC-I96V, pETLAC-R157H e pETLAC-4 ou tetra mutante (I96V, E134V, V138E, R157H). Com exceção do mutante pETLAC-L14P/Y18F ou duplo mutante, que contém, além da troca Y18F, uma mutação extra na qual a leucina da posição 14 foi substituída por uma prolina (L14P), todos os outros clones desta série apresentam apenas a mutação desejada, sem erros na seqüência, inserções ou deleções.

Os “primers” utilizados no sequenciamento estão descritos na tabela 5 e os eletroforetogramas das regiões mutagenizadas estão apresentados na figura 16.

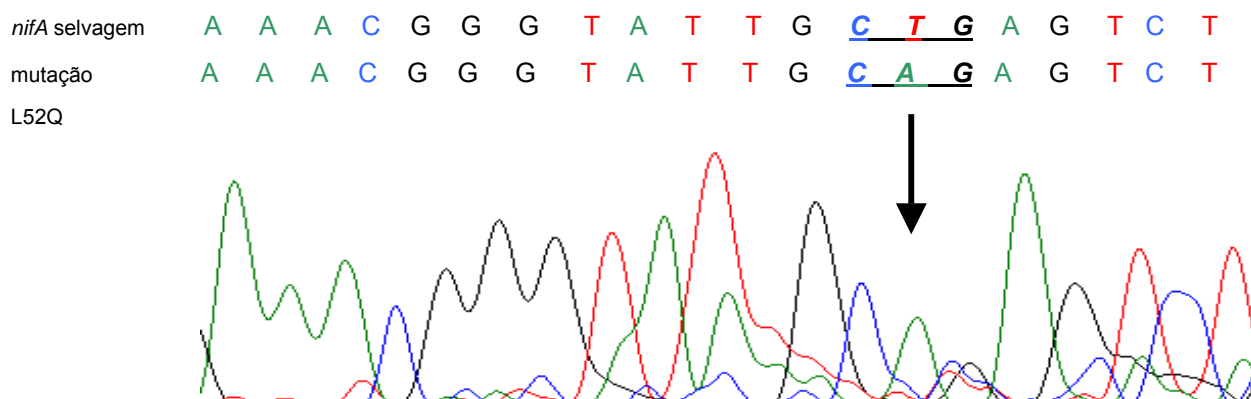
FIGURA 16 - ELETROFORETOGRAMAS DA REGIÃO MUTAGENIZADA DO GENE *nifA*.

a) pETLAC-cisY18F:

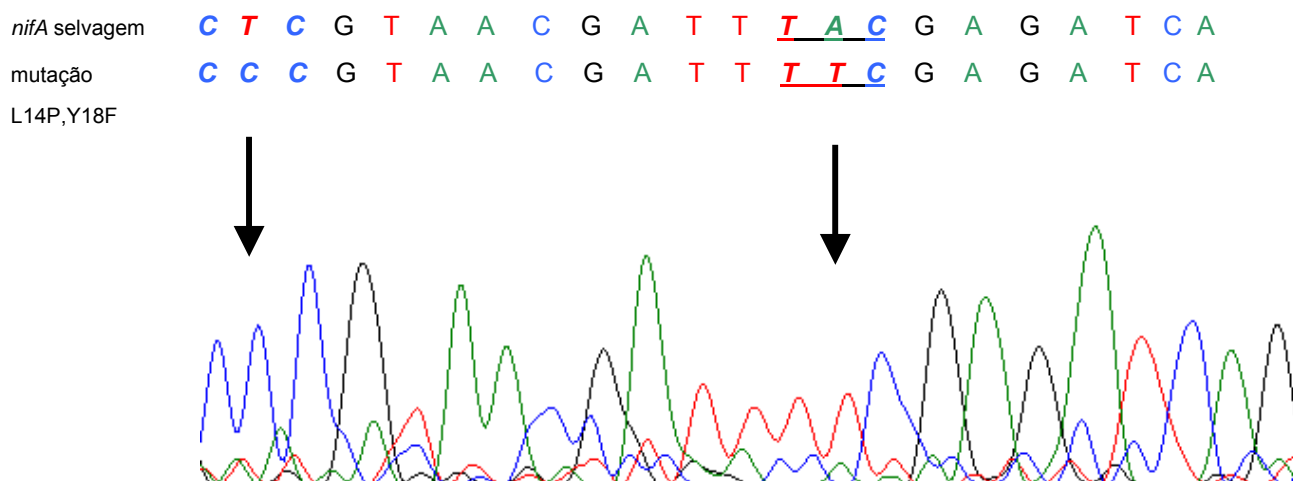
<i>nifA</i> selvagem -	C	T	C	G	T	A	A	C	G	A	T	T	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	G	A	G	A	T	C	A
mutação Y18F	C	T	C	G	T	A	A	C	G	A	T	T	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	G	A	G	A	T	C	A



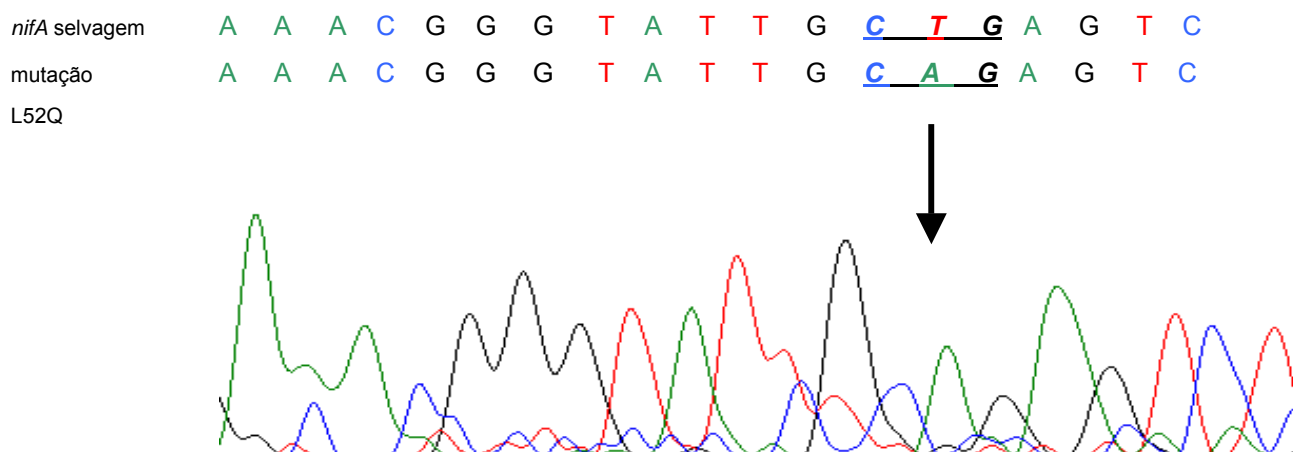
b) pETLAC-cisL52Q:



c) pETLAC-L14P/Y18F:

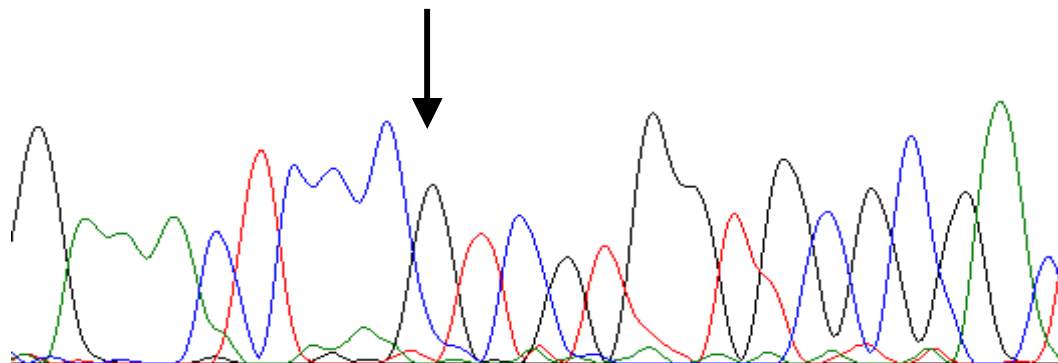


d) pETLAC-L52Q:



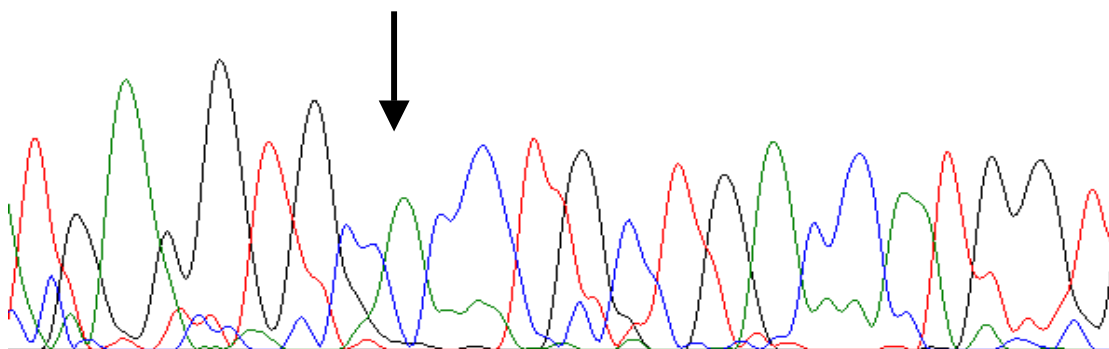
e) pETLAC-I96V:

nifA selvagem G A A A C T C C C A T C G T G G T G C G C G A
 mutação G A A A C T C C C G T C G T G G T G C G C G A
 I96V



f) pETLAC-R157H:

nifA selvagem T G A G G T G C G C C T G C T G A C C A T G G
 mutação T G A G G T G C A C C T G C T G A C C A T G G
 R157H



Os eletroforetogramas foram obtidos através da reação de sequenciamento e leitura no sequenciador. O programa BioEdit foi utilizado para visualização. As regiões sublinhadas indicam os códons modificados pela mutagênese. Acima da sequência do eletroforetograma estão as sequências dos genes *nifA* (selvagem e mutagenizado). As setas indicam as bases mutagênizadas no gene *nifA*.

4.3 LIGAÇÃO DOS FRAGMENTOS MUTAGENIZADOS NO VETOR pLAFR3.18

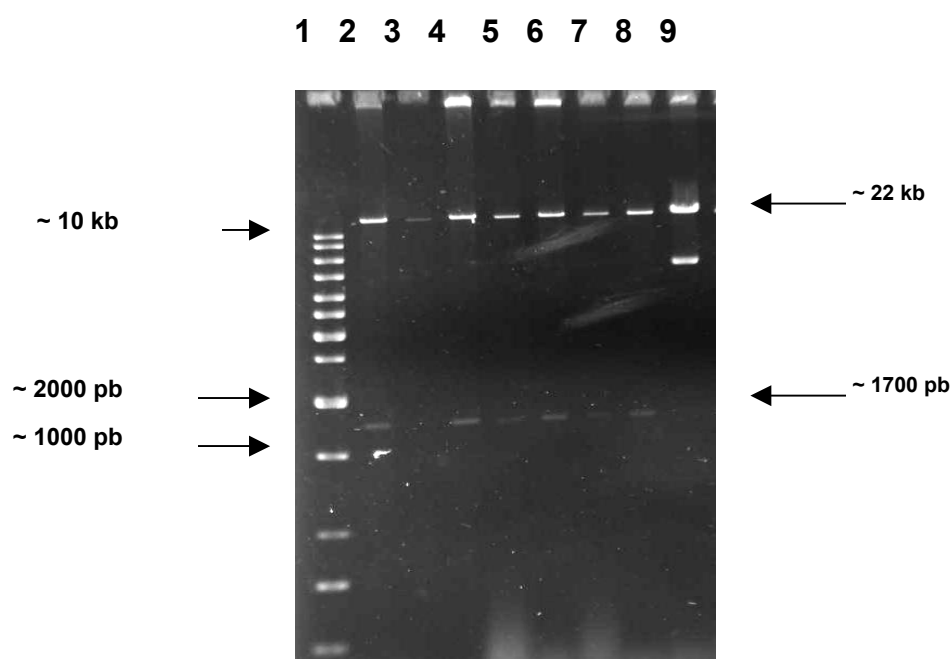
Os genes *nifA* mutagenizados foram clonados em vetor pLAFR3.18, para utilização nos ensaios de fisiologia devido a estabilidade deste vetor em *H. seropedicae* e *A. brasilense*. Para isso, um fragmento *XbaI-HindIII*, obtido da restrição dos clones das séries pETLAC e pETLAC-cis, foi ligado ao vetor pLAFR3.18 (3.12). Para a confirmação dos clones, foi realizada restrição do DNA plasmidial com as enzimas *XbaI* e *HindIII*, que liberam o inserto do vetor gerando fragmentos de aproximadamente 1700 pares de base e 22 kb, respectivamente (figura 17).

Os produtos das clonagens passaram a compor a série de plasmídeos pLAC (tabela 2) e caracterizam-se por expressarem as proteínas NifA-His mutagenizadas sob controle do sítio de ligação de ribossomo (RBS) do plasmídeo pET28a e sob controle transcricional do promotor *lac* (*plac*). Os plasmídeos recombinantes foram transferidos para estirpes de *H. seropedicae* e *A. brasilense* para estudar o efeito das proteínas NifA mutantes na fixação e metabolismo do nitrogênio nestes organismos.

4.4 LIGAÇÃO DOS FRAGMENTOS MUTAGENIZADOS NO VETOR pDK7 E CO-INTEGRAÇÃO COM pMP220

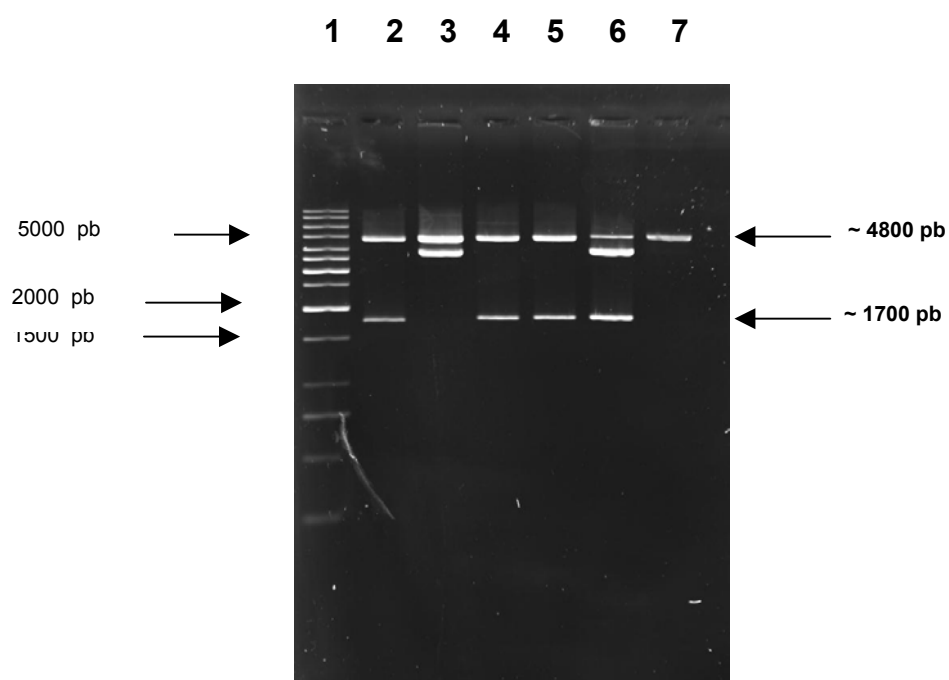
O fragmento *XbaI-HindIII*, obtido da restrição dos clones das séries pETLAC e pETLAC-cis também foi ligado ao vetor pDK7, previamente digerido com as mesmas enzimas (3.12). Para obtenção dos clones, o DNA plasmidial foi submetido a restrição com as enzimas *XbaI* e *HindIII*, que liberam o inserto do vetor gerando fragmentos de aproximadamente 1700 e 4800 pares de base, respectivamente (figura 18). Os produtos das clonagens passaram a compor a série de plasmídeos pDKLAC e estes plasmídeos expressam as proteínas NifA-His mutagenizadas sob controle do sítio de ligação de ribossomo (RBS) do plasmídeo pET28a e sob controle transcricional do promotor *tac* (*ptac*).

FIGURA 17 - PADRÃO DE BANDAS OBTIDAS APÓS RESTRIÇÃO DOS CLONES DA SÉRIE pLAC



Eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 1X, corado com brometo de etídeo com a imagem capturada em um sistema de vídeo-documentação. **1:** marcador de pares de base 1kb DNA Ladder; **2:** pRAMM1, **4 a 8:** clones da série pLAC (4-pLAC-L14P/Y18F, 5-pLAC-L52Q, 6-pLAC-I96V, 7-pLAC-R157H, 8-pLAC4); **3 e 9:** plasmídeos sem DNA-inserto correspondente a *nifA*. O tamanho correspondente das bandas esperadas está à direita.

FIGURA 18 - PADRÃO DE BANDAS OBTIDAS APÓS RESTRIÇÃO DOS CLONES DA SÉRIE pDKLAC.



Eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 1X, corado com brometo de etídeo com a imagem capturada em um sistema de vídeo-documentação. **1:** marcador de pares de base 1kb DNA Ladder; **2:** pRAMM3, **4 e 5:** clones da série pDKLAC (4-pDKLAC-I96V e 5-pDKLAC-R157H); **3 e 6:** plasmídeos sem DNA-inserto correspondente a *nifA*; **7:** pDK7 digerido com *Xba* e *HindIII*. O tamanho correspondente das bandas esperadas está à direita.

Para os ensaios em *H. seropedicae* e *A. brasilense*, os plasmídeos da série pDKLAC foram co-integrados ao vetor pMP220 através do sítio de restrição *HindIII* (3.13). Os produtos das clonagens obtidos passaram a compor a série de plasmídeos pMPLAC e estes plasmídeos caracterizam-se por expressarem as proteínas NifA-His mutagenizadas sob controle transcricional do promotor *tac*, que tem nível de expressão maior que o promotor *lac* e tem indução controlada por IPTG.

4.5 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS NIFA SELVAGEM E MUTANTES

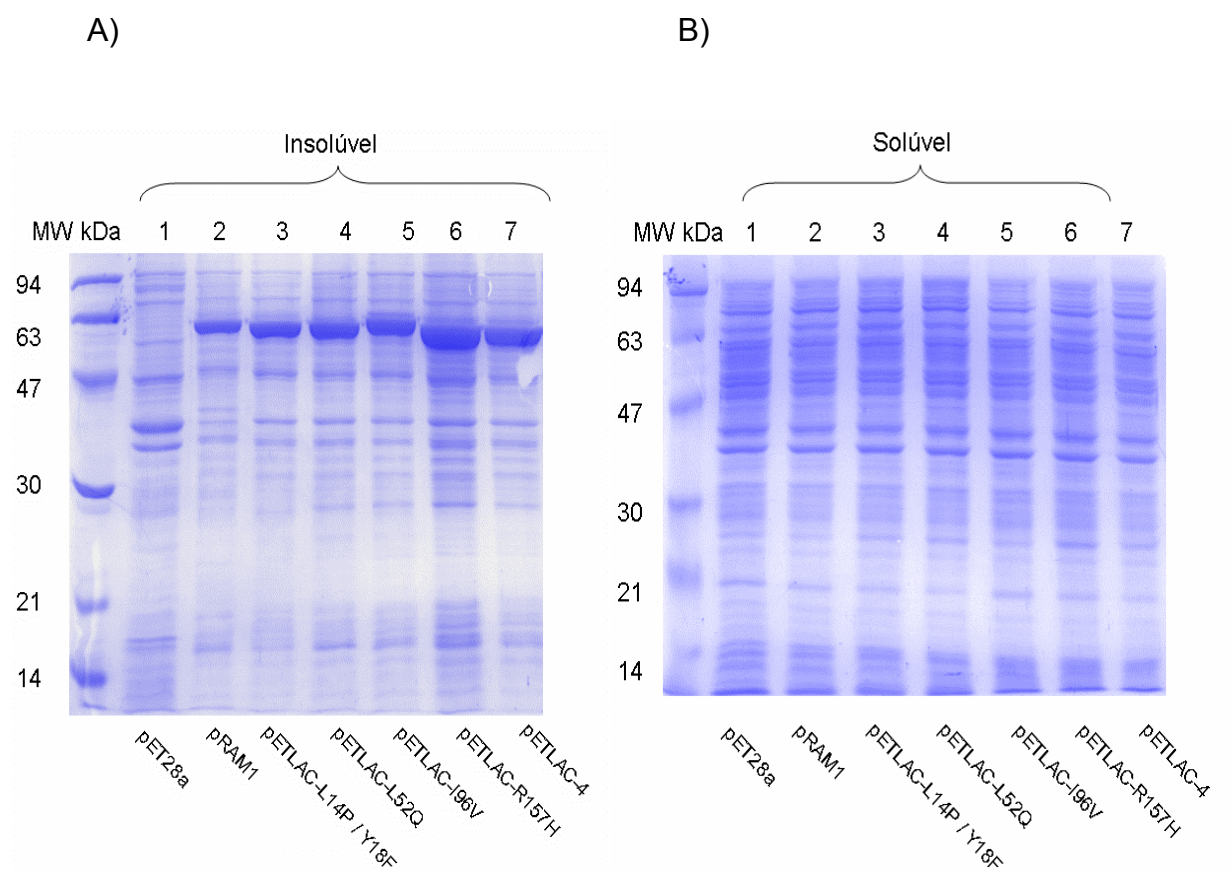
As proteínas NifA-His selvagem e mutantes foram superexpressas a partir dos promotores *T7* e *tac*, utilizando os vetores pET28a e pDK7, respectivamente (tabela 2).

4.5.1 Expressão das proteínas NifA mutagenizadas a partir do promotor *T7*

As proteínas NifA-His mutagenizadas das séries pETLAC e pETLAC-cis foram expressas na estirpe de *E. coli* BL21 (λ DE3) pLysS. As células foram induzidas com 1 mmol/L IPTG a 37°C durante três horas (3.16). O IPTG induziu a síntese da *T7* RNA polimerase e desbloqueou a região operadora situada a montante do RBS (“Ribosome Binding Site”) do vetor que está sob efeito do repressor *lacI^q*, permitindo desta forma a expressão das proteínas de fusão.

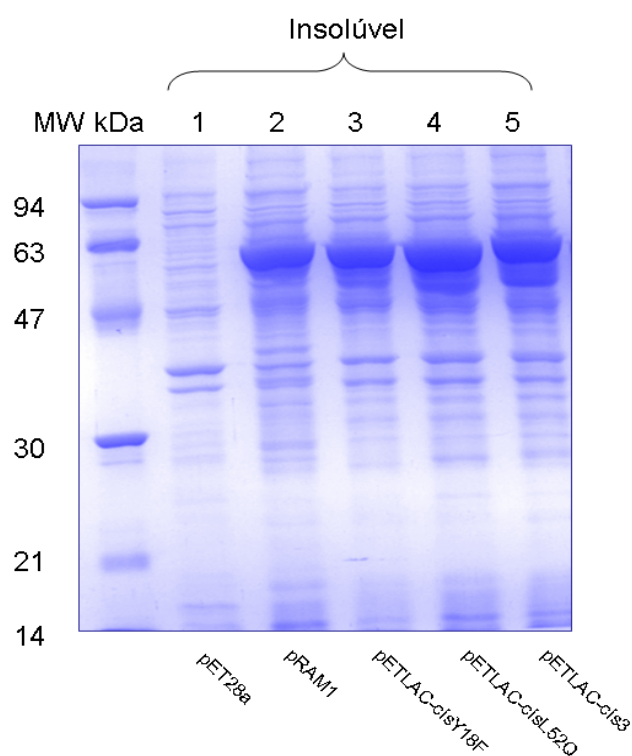
Após o período de indução as células foram coletadas por centrifugação, lisadas e o extrato foi separado por centrifugação em fração solúvel e insolúvel. As frações foram analisadas em SDS-PAGE (3.16). Os resultados permitem concluir que todas as proteínas recombinantes foram expressas com cerca de 62 kDa, coincidindo com o tamanho da proteína NifA de *H. seropedicae* expressa a partir do plasmídeo pRAM1 (controle positivo) e estiveram presentes predominantemente na fração insolúvel do extrato quando superexpressas em *E. coli* (figuras 19 e 20), resultado já observado por Monteiro e colaboradores (2001).

FIGURA 19 - EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS NIFA MUTANTES DA SÉRIE pETLAC



Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% de proteínas do extrato de células de *E. coli* BL21 (λ DE3) pLysS. **A:** Fração insolúvel do extrato; **B:** Fração solúvel do extrato. **MW:** Marcador de massa molecular indicado em kDa. **1:** vetor pET28a; **2:** Controle positivo – pRAM1; **3:** pETLAC-L14P/Y18F; **4:** pETLAC-L52Q; **5:** pETLAC-I96V; **6:** pETLAC-R157H, **7:** pETLAC-4.

**FIGURA 20 - EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS NIFA MUTANTES DA SÉRIE
pETLAC-cis**



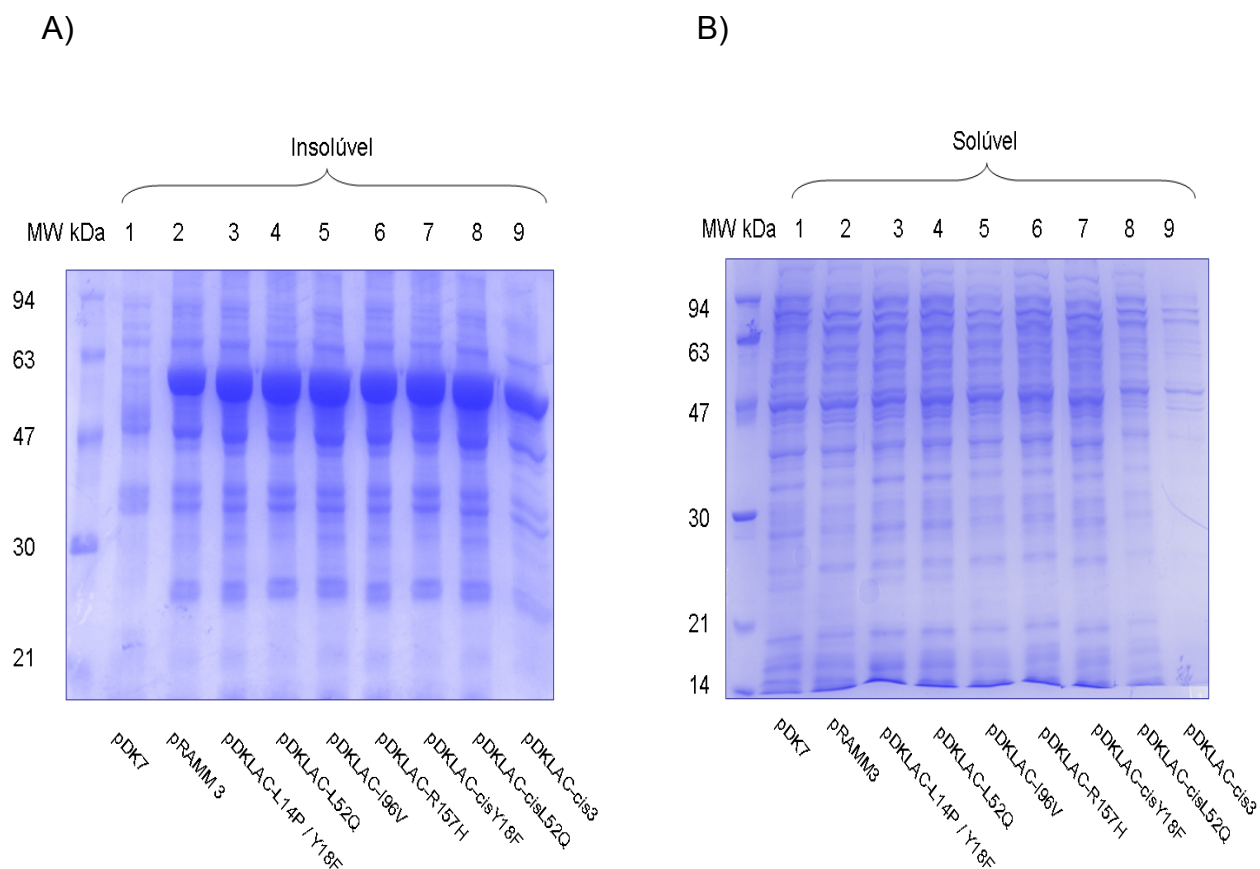
Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% de proteínas do extrato de células de *E. coli* BL21 (λ DE3) pLysS. **MW:** Marcador de massa molecular indicado em kDa. **1:** vetor pET28a; **2:** Controle positivo – pRAM1; **3:** pETLAC-cisY18F; **4:** pETLAC-cisL52Q; **5:** pETLAC-cis3.

4.5.2 Expressão das proteínas NifA mutagenizadas a partir do promotor *tac*

As proteínas NifA-His mutagenizadas da série pDKLAC foram expressas na estirpe de *E. coli* YMC. O vetor pDK7 possui o promotor híbrido *tac*, que contém a região -10 do promotor *lac* UV5 e a região -35 do promotor *trp* (AMANN, BROSIUS & PTASHNE, 1983). As células foram induzidas com 1 mmol/L IPTG a 37° C durante três horas.

Após o período de indução as células foram coletadas, lisadas e o extrato separado por centrifugação em fração solúvel e insolúvel e as frações foram analisadas em SDS-PAGE (figura 21) (3.16). Semelhante ao observado para os plasmídeos das séries pETLAC e pETLAC-cis, todas as proteínas recombinantes foram expressas, com cerca e 62 kDa, predominantemente na fração insolúvel do extrato.

FIGURA 21 - EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS NIFA MUTANTES DA SÉRIE pDKLAC



Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% de proteínas do extrato de células de *E. coli* YMC. **A:** Fração insolúvel do extrato; **B:** Fração solúvel do extrato. **MW:** Marcador de massa molecular indicado em kDa. **1:** vetor pDK7; **2:** Controle positivo – pRAMM3; **3:** pDKLAC-L14P/Y18F; **4:** pDKLAC-L52Q; **5:** pDKLAC-I96V; **6:** pDKLAC-R157H. **7:** pDKLAC-cisY18F; **8:** pDKLAC-cisL52Q; **9:** pDKLAC-cis3.

4.6 ANÁLISE FISIOLÓGICA DAS PROTEÍNAS NIFA MUTAGENIZADAS

As proteínas mutantes obtidas foram ensaiadas “in vivo” em *E. coli*, *H. seropedicae* e *A. brasilense* para avaliar suas atividades.

4.6.1 Capacidade de ativação transcricional das proteínas NifA mutantes em *E. coli*.

A função de ativador transcricional das proteínas NifA mutagenizadas no domínio N-terminal foi testada nas estirpes de *E. coli* JM109 (DE3) e YMC 10.

A estirpe JM109(DE3) é produtora da RNA polimerase do fago T7 e foi utilizada para verificar a atividade das proteínas mutantes das séries pETLAC e pETLAC-cis, expressas a partir do promotor *T7*. As proteínas mutantes destas séries foram expressas nas culturas da estirpe de *E. coli* JM109(DE3) previamente transformadas com o plasmídeo pRT22. Esse plasmídeo contém a região que codifica a enzima β -galactosidase, com a expressão controlada pelo promotor do gene *nifH* de *K. pneumoniae*. O nível basal de atividade de β -galactosidase em *E. coli* foi determinado em ensaios contendo apenas o plasmídeo pRT22. Os demais transformantes continham, além deste plasmídeo, os plasmídeos da série pETLAC/pETLAC-cis. Como controle positivo foi utilizado a estirpe JM109(DE3) transformada com os plasmídeos pRT22 e pRAM2, que expressa a proteína NifA N-truncada, a qual em *E. coli*, é capaz de ativar a transcrição *nifH::lacZ* e estimular a síntese da enzima β -galactosidase mesmo na presença de amônio (MONTEIRO *et al.*, 1999b).

A estirpe YMC 10 foi utilizada para verificar a atividade das proteínas mutantes da série pDKLAC, expressas a partir do promotor *tac*. As proteínas mutantes desta série foram expressas nas culturas da estirpe de *E. coli* YMC 10 anteriormente transformadas com o plasmídeo pEMS140. Esse plasmídeo contém a região que codifica a enzima β -galactosidase, com a expressão controlada pelo promotor do gene *nifB* de *H. seropedicae*, ativado pela NifA. A estirpe de *E. coli* YMC 10 (pEMS140), igualmente a JM109(DE3) (pRT22), possui baixa atividade de β -

galactosidase basal. Como controle positivo foi utilizado YMC (pEMS140 e pRAMM4), que é capaz de ativar a transcrição *nifB::lacZ* e a síntese da enzima β -galactosidase. Tendo em vista que NifA é sensível ao oxigênio os ensaios foram realizados em condições de anaerobiose. Os resultados dos ensaios de determinação da atividade das proteínas NifA mutagenizadas em *E. coli* estão apresentados na tabela 10.

De acordo com os dados apresentados é possível verificar que as proteínas NifA N-truncadas (pRAM2 e pRAMM4) ativam os promotores *nifH* ou *nifB* a montante de *lacZ* tanto na presença quanto ausência de amônio. Este resultado era esperado e já foi observado anteriormente (MONTEIRO *et al.*, 1999a; SOUZA *et al.*, 1999; ETTO, 2006). Porém, assim como a proteína NifA selvagem (pRAM1 e pRAMM3), as proteínas NifA mutantes (séries pETLAC/pETLAC-cis e pDKLAC), superexpressas a partir de promotores fortes, falharam em ativar a expressão de *nifH::lacZ* ou *nifB::lacZ* em todas as condições testadas. Após o ensaio de β -galactosidase, a expressão das proteínas foi verificada em gel de SDS-PAGE (figuras 19, 20 e 21).

4.6.2 Atividade de Nitrogenase

Para verificar a funcionalidade das proteínas NifA mutantes, os plasmídeos da série pLAC foram introduzidos nas estirpes SmR54 (mutante *nifA*, fenótipo Nif⁻) e LNGlnKDel (mutante *glnK*, fenótipo Nif⁻) de *H. seropedicae*, e na estirpe FP10 (mutante *nifA*, fenótipo Nif⁻) de *A. brasilense* e os plasmídeos da série pMPLAC foram transferidos às estirpes SmR54 e FP10. Os transconjugantes foram ensaiados para atividade da nitrogenase em meio NFbHP-malato/lactato semi-sólido, sob condições de desrepressão da nitrogenase (0,4 mmol/L de glutamato) ou em condições de repressão (20 mmol/L de NH₄Cl). Como controles foram utilizadas as estirpes selvagens SmR1 de *H. seropedicae* e FP2 de *A. brasilense*.

TABELA 10 - DETECCÃO DA CAPACIDADE DE ATIVAÇÃO TRANSCRICIONAL DAS PROTEÍNAS NIFA MUTAGENIZADAS EM *E. coli*.

Atividade de β -galactosidase (unidades Miller)						
Estirpe	JM109 (DE3) + pRT22*		YMC 10 + pEMS140**			
	Plasmídeo	Condição		Plasmídeo	Condição	
		+NH ₄	-NH ₄		+NH ₄	-NH ₄
SEM		19 \pm 4	21 \pm 5	SEM	15 \pm 2	12 \pm 3
pRAM1 (pET28a::nifA)		15 \pm 2	18 \pm 2	pRAMM3 (pDK7::nifA)	7 \pm 4	13 \pm 2
pRAM2 (pET28a:: Δ NnifA)		574 \pm 13	498 \pm 17	pRAMM4 (pDK7:: Δ NnifA)	640 \pm 22	563 \pm 18
pETLACL14F/Y18F (pET28a:: nifA mut.)		12 \pm 4	18 \pm 3	pDKLACL14F/Y18F (pDK7:: nifA mut.)	4 \pm 1	3 \pm 2
pETLACL52Q (pET28a:: nifA mut.)		18 \pm 3	14 \pm 6	pDKLACL52Q (pDK7:: nifA mut.)	5 \pm 4	13 \pm 6
pETLACI96V (pET28a:: nifA mut.)		16 \pm 7	21 \pm 5	pDKLACI96V (pDK7:: nifA mut.)	12 \pm 2	13 \pm 4
pETLACR157H (pET28a::nifA mut.)		8 \pm 3	15 \pm 2	pDKLACR157H (pDK7::nifA mut.)	12 \pm 4	11 \pm 2
pETLAC-4 (pET28a::nifA mut.)		12 \pm 4	15 \pm 2	pDKLAC-4 (pDK7::nifA mut.)	8 \pm 1	6 \pm 7
pETLAC-cisY18F (pET28a:: nifA mut.)		13 \pm 1	19 \pm 7	pDKLAC-cisY18F (pDK7:: nifA mut.)	6 \pm 5	5 \pm 4
pETLAC-cisL52Q (pET28a:: nifA mut.)		12 \pm 5	23 \pm 4	pDKLAC-cisL52Q (pDK7:: nifA mut.)	5 \pm 7	3 \pm 4
pETLAC-cis3 (pET28a:: nifA mut.)		13 \pm 7	17 \pm 4	pDKLAC-cis3 (pDK7:: nifA mut.)	10 \pm 2	7 \pm 3

*pRT22: fusão *nifH K. pneumoniae::lacZ* ;

**pEMS140: fusão *nifB H. seropedicae::lacZ*

+NH₄ (20 mmol/L de NH₄Cl) e -NH₄ (10 ug/mL de casaminoácidos).

A atividade de β -galactosidase foi determinada como descrito por MILLER (1992). A capacidade de ativação transcricional das proteínas NifA mutadas em foi determinada em *E. coli* JM109 (DE3) e YMC através da ativação da expressão das fusões *nifH::lacZ* e *nifB::lacZ* e medida da atividade de β -galactosidase. Os ensaios foram realizados como descrito em material e métodos (3.19.1.1). Os valores correspondem à média de 3 experimentos independentes.

4.6.2.1 Complementação da estirpe mutante SmR54 de *H. seropedicae*

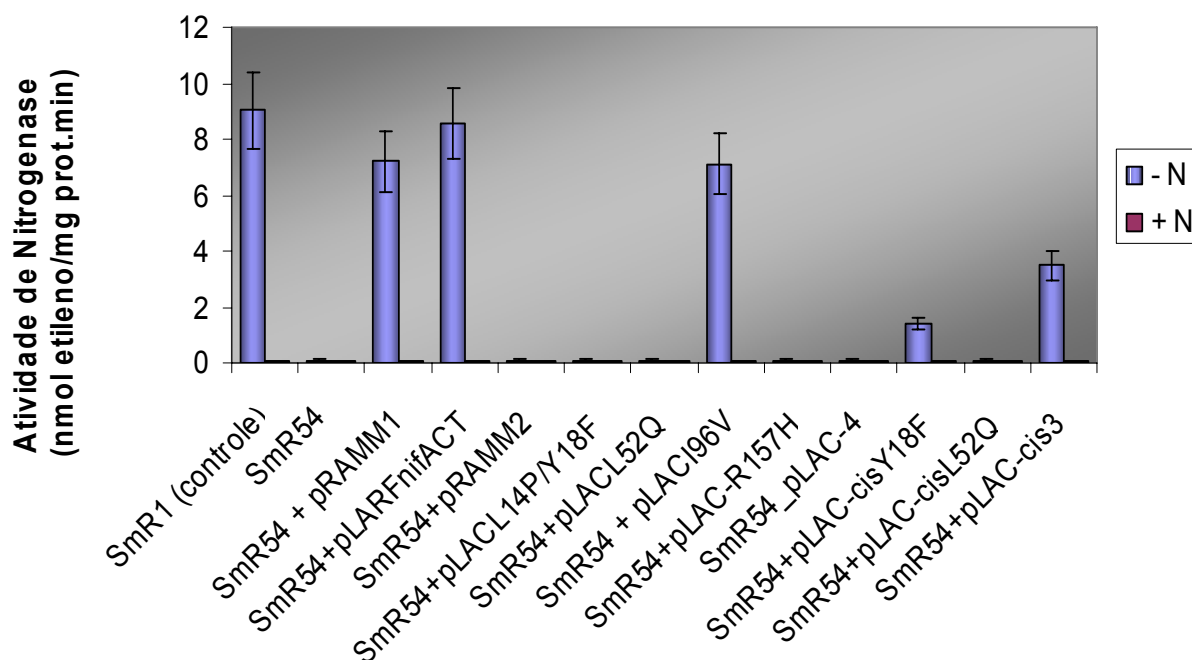
Para determinar as atividades das proteínas NifA-His mutantes em *H. seropedicae*, os plasmídeos da série pLAC (pLAFR3.18::*nifA* mut), pRAMM1 (pLAFR3.18::*nifA*), pRAMM2 (pLAFR3.18:: Δ N*nifA*) e pLAFR3.18nifACT (pLAFR3.18:: Δ N*nifA*, com região promotora de *nifA*) foram introduzidos na estirpe mutante SmR54 por conjugação e os transconjugantes foram ensaiados como descrito acima.

As atividades de nitrogenase obtidas para as proteínas NifA selvagem, NifA mutantes e NifA N-truncada estão apresentadas na figura 22 e foram observadas apenas em condições de desrepressão (0,4 mmol/L de glutamato). A estirpe selvagem SmR1 apresentou atividade de nitrogenase (aproximadamente 9 nmol etileno. mg prot⁻¹. min⁻¹), enquanto que a estirpe SmR54 (*nifA*⁻) foi incapaz de fixar nitrogênio. As proteínas NifA selvagem (pRAMM1) e NifA-I96V (pLAC-I96V) são capazes de restaurar quase completamente o fenótipo de fixação de nitrogênio da estirpe SmR54 de *H. seropedicae*. O mesmo foi observado com a proteína N-truncada sem a cauda His e que foi expressa a partir do promotor de *nifA* (pLAFR3.18nifACT). A atividade de nitrogenase verificada para o mutante NifA-I96V é semelhante a atividade obtida pela NifA selvagem (pRAMM1) e é aproximadamente 15% menor que aquela observada na estirpe selvagem de *H. seropedicae* SmR1. Já o mutante NifA-Y18F (pLAC-cisY18F) e o triplo mutante NifA-I96V, E134V, V138E (pLAC-cis3) complementaram parcialmente a estirpe SmR54, uma vez que apresentaram atividades 75% e 60% menores, respectivamente, do que a atividade de nitrogenase da estirpe SmR1.

Quando comparada com SmR1, a proteína NifA-His selvagem (pRAMM1) apresenta menor atividade. Essa diminuição pode estar ocorrendo devido a presença da sequência de resíduos de histidinas (His-tag) fusionados ao domínio N-terminal de NifA, que afetaria de alguma forma a estabilidade da proteína e portanto sua atividade, assim como a atividade das variantes de NifA-His. A proteína NifA N-truncada (pRAMM2) foi incapaz de complementar a estirpe SmR54, diferentemente do observado para NifA N-truncada expressa a partir do promotor próprio (pLAFR3.18nifACT). Os mutantes NifA-L14P/Y18F (pLACL14P/Y18F), NifA-L52Q (pLAC-L52Q e pLAC-cisL52Q), NifA-R157H (pLAC-R157H) e o tetra mutante NifA-

I96V, E134V, V138E, R157H (pLAC-4) foram incapazes de complementar o fenótipo Nif⁻ de SmR54. Esta ausência de atividade pode ser decorrente da instabilidade das proteínas NifA mutantes ocasionada por mudanças conformacionais ou pela falha na interação de NifA com proteínas necessárias para sua ativação, como PII.

FIGURA 22 - EFEITO DAS PROTEÍNAS NifA SELVAGEM, N-TRUNCADAS E MUTANTES EXPRESSAS A PARTIR DO PROMOTOR *lac* NA COMPLEMENTAÇÃO DE *H. seropedicae* SmR54 (Nif⁻)



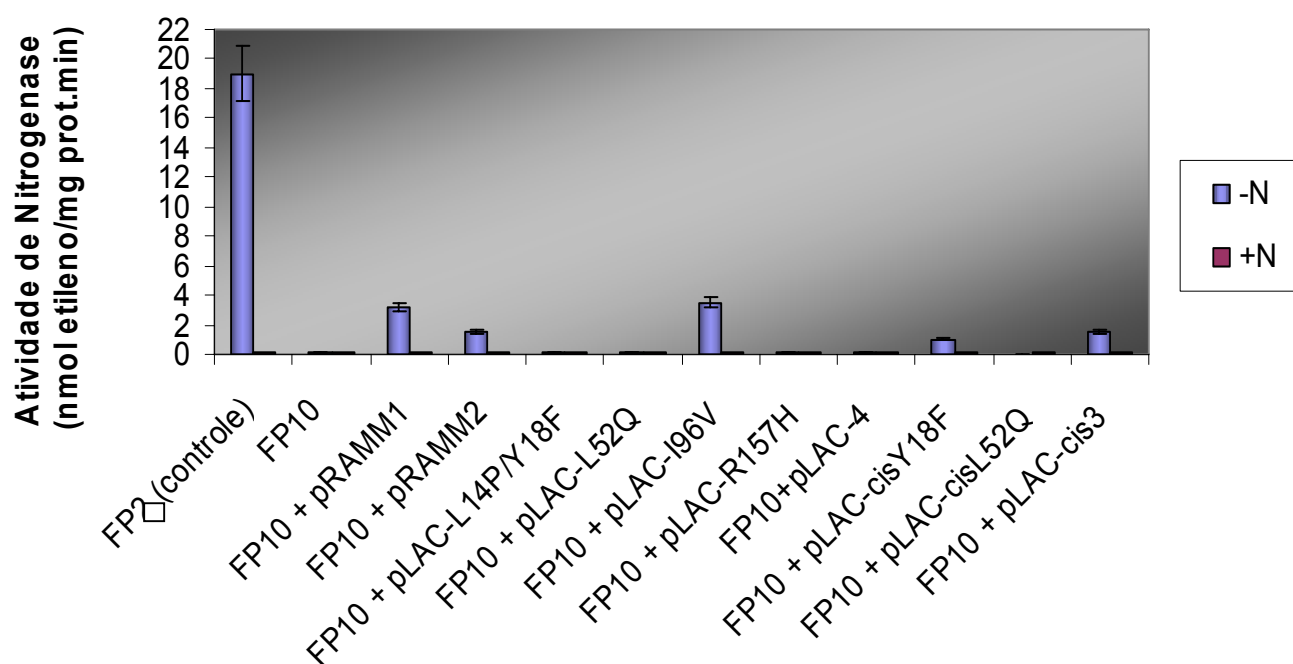
Atividade de nitrogenase das estirpes SmR1 (selvagem) e SmR54 (mutante *nifA*) complementado com os plasmídeos da série pLAC (variantes NifA), com o plasmídeo pRAMM1 (NifA selvagem) e com os plasmídeos pRAMM2 e pLARF3.18nifACT (NifA N-truncada). As médias obtidas resultam de cinco experimentos independentes. As células foram crescidas em meio NFbHP malato semi-sólido suplementado com 0,4 mmol/L de glutamato ou 20 mmol/L de NH₄Cl. O ensaio foi realizado após crescimento por um período de 20 a 30 horas a 30°C.

4.6.2.2 Complementação da estirpe mutante FP10 de *A. brasilense*

As proteínas NifA mutantes também foram ensaiadas em *A. brasilense*. Para examinar a atividade das proteínas NifA selvagem e mutantes de *H. seropedicae* em sistema heterólogo, os plasmídeos da série pLAC (pLAFR3.18::*nifA* mut), pRAMM1 (pLAFR3.18::*nifA*) e pRAMM2 (pLAFR3.18:: Δ N*nifA*) foram introduzidos por conjugação na estirpe mutante FP10 de *A. brasilense* e os transconjugantes foram ensaiados na presença de 0,4 mmol/L de glutamato ou 20 mmol/L de NH₄Cl.

Os transconjugantes só apresentaram atividade de nitrogenase em condições de desrepressão (0,4 mmol/L de glutamato) (figura 23). A estirpe selvagem FP2 apresentou uma atividade de aproximadamente 19 nmol etileno. mg prot.⁻¹. min⁻¹, enquanto a estirpe mutante *nifA* (FP10) foi incapaz de fixar nitrogênio. A presença, na estirpe FP10, dos plasmídeos contendo as diferentes formas de *nifA* mutagenizado, reproduziu o comportamento obtido nos ensaios realizados com a estirpe SmR54 de *H. seropedicae* (figura 22). Novamente, as proteínas NifA selvagem, NifA-I96V, NifA-Y18F e a triplo mutante NifA-I96V, E134V, V138E foram capazes de restaurar, ainda que parcialmente, o fenótipo de fixação de nitrogênio da estirpe *nifA*⁻ (*A. brasilense* FP10). Porém, as atividades obtidas foram até 50% menores que aquelas observadas em *H. seropedicae* SmR54 (figura 22), provavelmente por se tratar de um sistema heterólogo. Este ensaio já foi realizado anteriormente por Souza e colaboradores (1999) que demonstraram atividade de NifA de *H. seropedicae* em *A. brasilense*. Porém, as atividades observadas neste ensaio foram menores que as obtidas por Souza e colaboradores (1999) que empregaram uma NifA sem cauda de histidinas, sugerindo que a presença da His-tag também estaria interferindo na atividade de NifA. A proteína NifA N-truncada (pRAMM2) de *H. seropedicae* foi capaz de complementar parcialmente a estirpe FP10 de *A. brasilense* neste trabalho e no trabalho realizado por Souza e colaboradores (1999), confirmando a hipótese de que a proteína NifA N-truncada de *H. seropedicae* seja instável em seu próprio “background”.

FIGURA 23 - EFEITO DAS PROTEÍNAS NifA SELVAGEM, N-TRUNCADA E MUTANTES EXPRESSAS A PARTIR DO PROMOTOR *lac* NA COMPLEMENTAÇÃO DE *A. brasilense* FP10 (Nif⁻)



Atividade de nitrogenase das estirpes FP2 (selvagem) e FP10 (mutante *nifA*) complementado com os plasmídeos da série pLAC (variantes NifA), com o plasmídeo pRAMM1 (NifA selvagem) e com o plasmídeo pRAMM2 (NifA N-truncada). As médias obtidas resultam de cinco experimentos independentes. As células foram crescidas em meio NFbHP lactato semi-sólido suplementado com 0,4 mmol/L de glutamato ou 20 mmol/L de NH₄Cl. O ensaio foi realizado após crescimento por um período de 16 a 22 horas a 30°C.

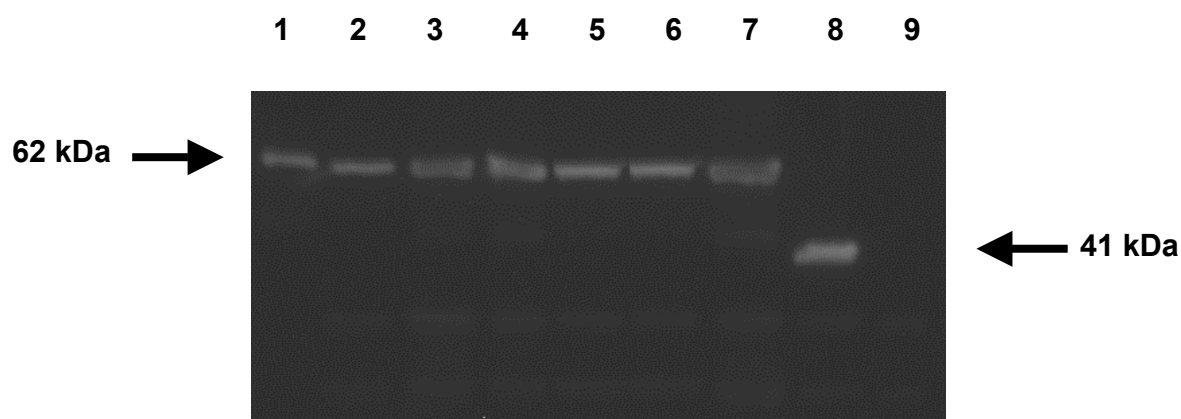
Assim como em *H. seropedicae* SmR54, os mutantes NifA-L14P/Y18F (pLACL14P/Y18F), NifA-L52Q (pLAC-L52Q e pLAC-cisL52Q), NifA-R157H (pLAC-R157H) e NifA- I96V, E134V, V138E, R157H (pLAC-4) foram incapazes de complementar o fenótipo Nif⁻ da estirpe de *A. brasilense* FP10.

Para verificar se estava ocorrendo expressão das proteínas mutantes, uma vez que algumas variantes NifA não apresentaram atividade de nitrogenase em *H. seropedicae* SmR54 e *A. brasilense* FP10, culturas de *E. coli* YMC contendo os plasmídeos da série pLAC, pRAMM1 e pRAMM2, que expressam NifA a partir do promotor *lac*, foram utilizadas em ensaios de imunodeteção (3.17). As proteínas expressas foram concentradas utilizando a resina Talon[®], que possui afinidade e especificidade por proteínas que contém a sequência de poli-histidinas (His-tag), e permitiu a concentração da proteína NifA sob condições desnaturantes. A imunodeteção foi realizada utilizando anticorpo anti-His que reconhece a sequência de histidinas (cauda His-tag) fusionada as proteínas NifA.

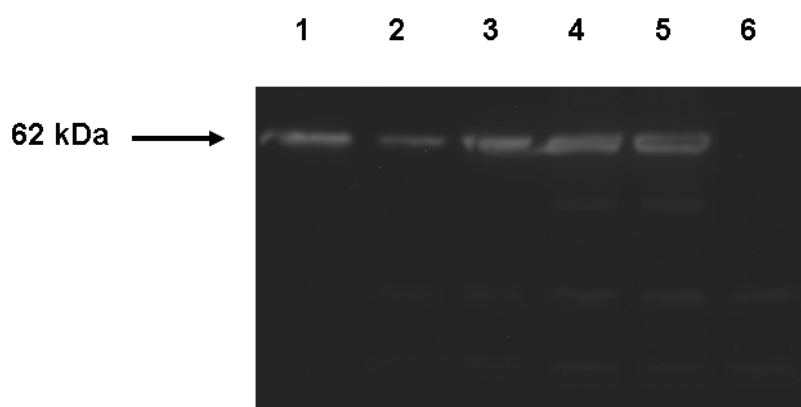
A figura 24 mostra os resultados do experimento realizado com o anticorpo anti-His. O controle positivo corresponde ao extrato celular de BL21(DE3) contendo o plasmídeo pRAM1 (NifA-His selvagem expressa a partir do promotor *T7*) e o controle negativo corresponde ao extrato celular de YMC 10 contendo plasmídeo pLAFR3.18. As células foram cultivadas por 16 horas a 37°C em meio LB. As proteínas foram expressas a partir do promotor *lac* (linhas 2 a 8 na figura A e linhas 2 a 5 na figura B), com exceção de pRAM1 (linha 1 nas figuras A e B) após indução com IPTG.

FIGURA 24 - ENSAIO DE IMUNODETECÇÃO DAS PROTEÍNAS NifA DE *H. seropedicae* (SÉRIE pLAC) EM *E. coli*

A)



B)



A) Linha 1 - Extratos celulares de *E. coli* BL21(DE3) contendo o plasmídeo pRAM1 (~ 50 ng de proteína). **Linhas 2 a 9** - Extratos celulares de *E. coli* YMC contendo os plasmídeos: **2** - pRAMM1; **3** - pLAC-Y18F; **4** - pLAC-L52Q; **5** - pLAC-I96V; **6** - pLAC-R157H; **7** - pLAC-4; **8** - pRAMM2; **9** - pLAFR3.18. **B) Linha 1** - Extratos celulares de *E. coli* BL21(DE3) contendo o plasmídeo pRAM1 (~ 50 ng de proteína). **Linhas 2 a 6** - Extratos celulares de *E. coli* YMC contendo os plasmídeos: **2** - pRAMM1; **3** - pLAC-cisY18F; **4** - pLAC-cisL52Q; **5** - pLAC-cis3; **6** - pLAFR3.18. A seta indicando 62 kDa corresponde a proteína NifA íntegra e a seta indicando 41 kDa corresponde a proteína NifA N-truncada.

O resultado do ensaio de imunodeteção permite concluir que tanto a proteína NifA N-truncada, quanto as proteínas íntegras NifA selvagem e NifA mutantes estavam sendo expressas em *E. coli*. Portanto, a ausência de atividade nos mutantes NifA-L14P/Y18F, NifA-L52Q, NifA-R157H e NifA-tetra mutante pode ser atribuída a presença das mutações, uma vez que é observada atividade nos mutantes NifA-Y18F, NifA-I96V e NifA-triplo mutante, que são expressos a partir da mesma construção.

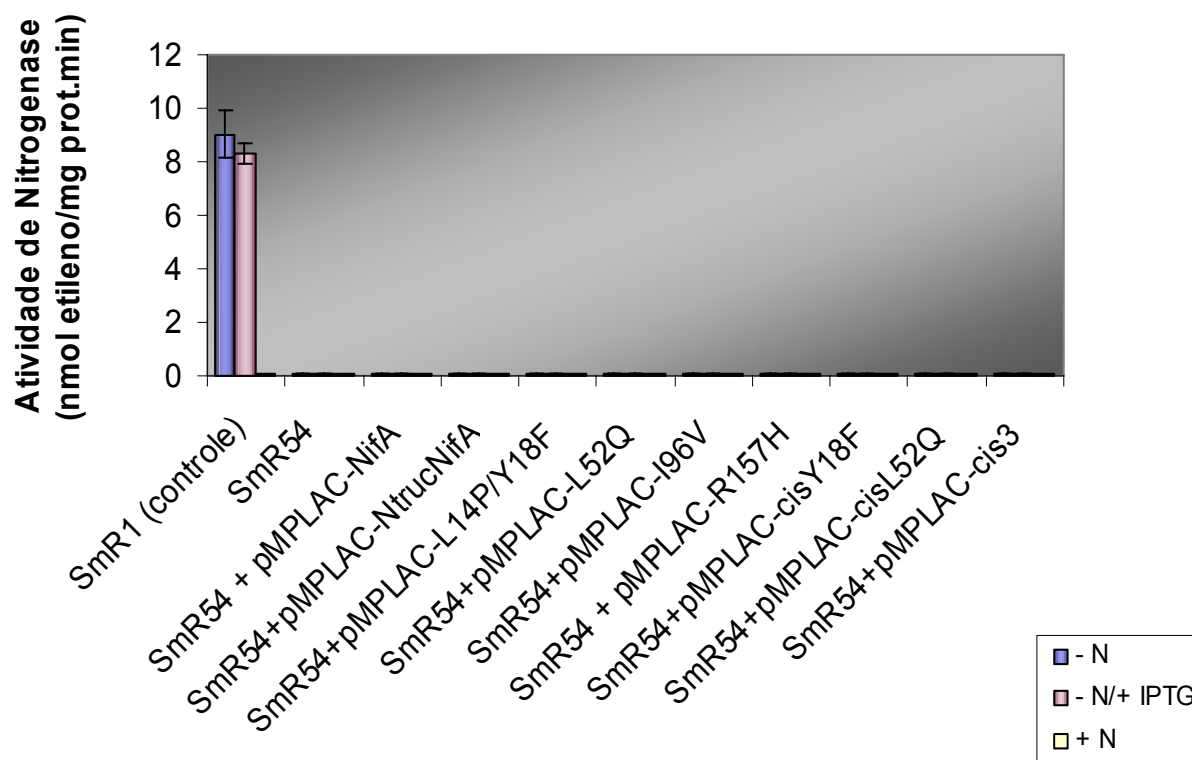
4.6.2.3 Complementação das estirpes mutantes SmR54 de *H. seropedicae* e FP10 de *A. brasilense* com os plasmídeos da série pMPLAC.

Para verificar se a baixa/ausente atividade de nitrogenase de *H. seropedicae* SmR54 e de *A. brasilense* FP10 na presença dos mutantes NifA e de NifA N-truncada era devido a baixa expressão do promotor *lac* (*plac*) presente no vetor pLAFR3.18, uma nova construção foi realizada de forma que a expressão das proteínas NifA passou a ser controlada pelo promotor *tac*, que em *E. coli* é um promotor mais forte e está sujeito a regulação pelos níveis de IPTG do meio. Para isso foram construídos os plasmídeos da série pMPLAC (3.13 e 4.4). Estes plasmídeos foram introduzidos por conjugação na estirpe SmR54 de *H. seropedicae* e o efeito da superexpressão das proteínas NifA selvagem, NifA mutantes e NifA N-truncada foi verificado determinando-se a atividade de nitrogenase nos transconjugantes, na presença de 0,4 mmol/L de glutamato ou 20 mmol/L de NH₄Cl.

Na figura 25 estão mostrados os resultados obtidos nos ensaios, além da atividade da estirpe selvagem SmR1, na ausência de amônio. Verifica-se que, tanto para NifA selvagem, N-truncada ou as variantes NifA não foi detectada atividade de nitrogenase em nenhuma das condições testadas, independente da presença de IPTG. Para verificar se esta ausência de atividade estaria ocorrendo devido a falta de expressão das proteínas, culturas de *E. coli* contendo os plasmídeos da série pMPLAC foram crescidas e as amostras foram analisadas por SDS-PAGE seguidas de imunodeteção usando anticorpo α -His (3.17). De acordo com as análises todas as proteínas desta construção (pMPLAC) estão sendo corretamente superexpressas em *E. coli* (dados não mostrados), porém o ensaio de expressão deve ser realizado

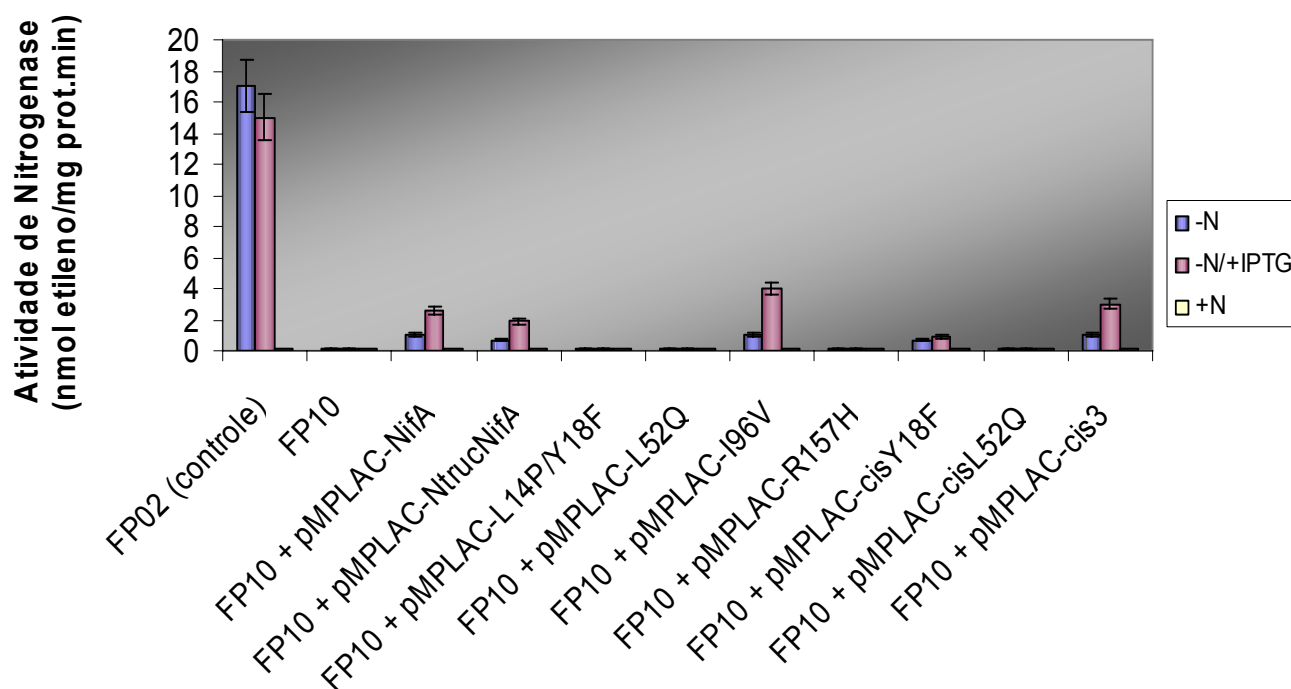
também em *H. seropedicae*.. Posteriormente os plasmídeos desta série foram introduzidos por conjugação na estirpe FP10 de *A. brasilense*, onde já foi demonstrada atividade de proteínas expressas a partir deste tipo de construção (HUERGO, 2006). Os resultados obtidos estão mostrados na figura 26.

FIGURA 25 - EFEITO DAS PROTEÍNAS NifA SELVAGEM, N-TRUNCADA E MUTANTES EXPRESSAS A PARTIR DO PROMOTOR *tac* NA COMPLEMENTAÇÃO DE *H. seropedicae* SmR54 (Nif⁻)



Atividade de nitrogenase das estirpes SmR1 (selvagem) e SmR54 (mutante *nifA*) complementado com os plasmídeos da série pMPLAC (variantes NifA), com o plasmídeo pMPLAC-NifA (NifA selvagem) e com o plasmídeo pMPLAC-NtruncNifA (NifA N-truncada). As médias obtidas resultam de cinco experimentos independentes. As células foram crescidas em meio NFbHP malato semi-sólido suplementado com 0,4 mmol/L de glutamato ou 20 mmol/L de NH₄Cl, na presença ou ausência de IPTG. O ensaio foi realizado após crescimento por um período de 20 a 30 horas a 30°C.

FIGURA 26 - EFEITO DAS PROTEÍNAS NifA SELVAGEM, N-TRUNCADA E MUTANTES EXPRESSAS A PARTIR DO PROMOTOR *tac* NA COMPLEMENTAÇÃO DE *A. brasilense* FP10 (Nif⁻)



Atividade de nitrogenase das estirpes FP02 (selvagem) e FP10 (mutante *nifA*) complementado com os plasmídeos da série pLAC (variantes NifA), com o plasmídeo pRAMM1 (NifA selvagem) e com o plasmídeo pRAMM2 (NifA N-truncada). As médias obtidas resultam de cinco experimentos independentes. As células foram crescidas em meio NFbHP lactato semi-sólido suplementado com 0,4 mmol/L de glutamato ou 20 mmol/L de NH₄Cl, na presença ou ausência de IPTG. O ensaio foi realizado após crescimento por um período de 16 a 22 horas a 30°C.

Foi observada atividade de nitrogenase parcial apenas para as variantes que já haviam apresentado esse comportamento anteriormente (figuras 22 e 23). Entretanto, apesar dessas atividades ainda serem baixas, observam-se aumentos de até 100% na presença de IPTG. Essas baixas atividades sugerem que, em *A. brasilense* provavelmente o promotor *tac* não seja tão forte quanto o promotor *lac* e que possivelmente, este sistema não seja estável em *H. seropedicae* e por isso foi verificado a ausência de atividade com todos os plasmídeos da série pMPLAC na estirpe SmR54.

4.6.2.4 Complementação da estirpe mutante LNGlnKDel de *H. seropedicae*

Em *H. seropedicae* a proteína NifA é ativadora dos genes *nif* e a sua atividade em resposta aos níveis de amônio intracelular é regulada pelo domínio N-terminal e envolve ainda as proteínas do tipo PII, que são necessárias para ativação de NifA (SOUZA *et al.*, 1999; MONTEIRO *et al.*, 1999).

Noindorf (2006) demonstrou que a estirpe mutante de *H. seropedicae* LNGlnB (mutante *glnB*) apresentou atividade de nitrogenase semelhante a da estirpe SmR1. Entretanto a estirpe LNGlnKDel (mutante *glnK*) apresentou apenas 5% da atividade observada para SmR1. O fenótipo Nif selvagem da estirpe LNGlnKDel foi restaurado por um plasmídeo que continha o operon *orf1glnKamtB*, indicando que a proteína GlnK está envolvida com a regulação da fixação de nitrogênio neste organismo. A proteína NifA N-truncada contendo a região promotora do gene *nifA* (pLAFR3.18nifACT) também é capaz de restaurar o fenótipo Nif da estirpe LNGlnKDel, enquanto que a proteína NifA íntegra (pRAMM1) não complementa o fenótipo Nif desta estirpe. Estes resultados sugerem que no mutante *glnK* a atividade de NifA está comprometida e é dependente de GlnK. Como a proteína NifA N-truncada é ativa independente da presença de GlnK, sugere-se que esta proteína controle a atividade de NifA por uma interação direta ou indireta com seu domínio N-terminal (NOINDORF, 2006).

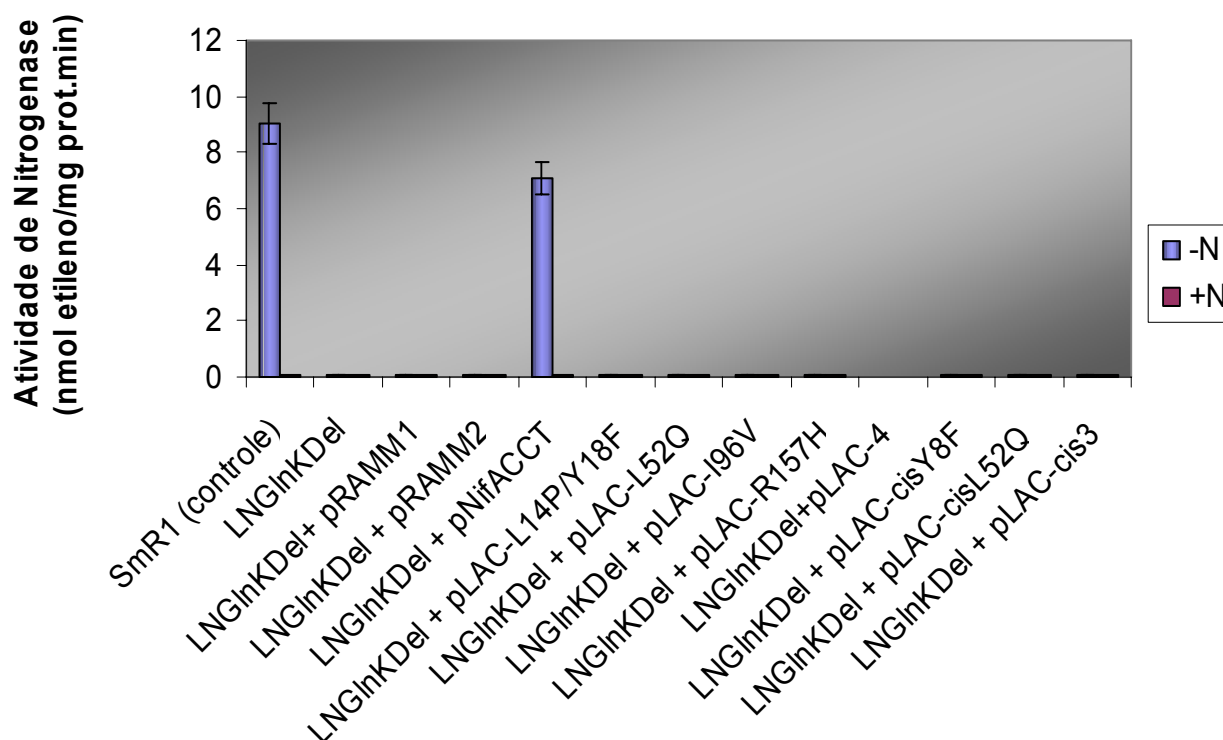
A importância das proteínas PII para atividade de NifA também foi observada em *A. brasilense*, onde a proteína NifA só é ativa na ausência de amônio e uma proteína tipo PII (GlnB) é necessária para prevenir a inibição exercida pelo domínio

N-terminal. Na presença de amônia, o domínio N-terminal está inibindo o restante da proteína NifA, provavelmente porque PII é incapaz de manter NifA na sua forma ativa. Em *A. brasilense* a proteína NifA N-truncada também é ativa independente da presença de amônio ou PII (ARSENE *et al.*, 1996). Além disso, foi observado que mutações no domínio N-terminal de NifA, fazem com que esta seja ativa independente da presença de GlnB. Os mutantes NifA-Y18F, NifA-Y53F e NifA-Y18F/Y53F de *A. brasilense* são capazes de complementar o fenótipo Nif⁻ de uma estirpe mutante *glnB*, que não apresenta atividade de nitrogenase neste organismo. Isto sugere que estes aminoácidos possuam um papel importante na interação com proteínas PII e na manutenção do efeito inibitório do domínio N-terminal na atividade de NifA (ARSENE *et al.*, 1999, CHEN *et al.*, 2005).

Como já descrito, a proteína NifA de *H. seropedicae* é inativa na ausência da proteína GlnK, portanto para verificar se algum(s) dos resíduos de aminoácidos trocados pode abolir a necessidade de uma ativação via proteína PII, as variantes de NifA produzidas neste trabalho foram testadas na estirpe mutante *glnK*. Para tal, os plasmídeos da série pLAC (pLAFR3.18::*nifA* mut), pRAMM1 (pLAFR3.18::*nifA*), pRAMM2 (pLAFR3.18::Δ*NnifA*) e pLAFR3.18nifACT (pLAFR3.18::Δ*NnifA*, com região promotora de *nifA*) foram introduzidos na estirpe de *H. seropedicae* LNGlnKDel e os transconjugantes foram ensaiados na presença de 0,4 mmol/L de glutamato ou 20 mmol/L de NH₄Cl.

De acordo com a figura 27 pode ser observado que, em baixas concentrações de nitrogênio (0,4 mmol/L de glutamato), apenas o plasmídeo pLAFR3.18nifACT, o qual contém a proteína NifA N-truncada expressa a partir do promotor próprio, foi capaz de complementar a estirpe LNGlnKDel e apresentar fenótipo de fixação de nitrogênio próximo ao da estirpe SmR1. Assim como NifA selvagem, as variantes NifA não complementaram o fenótipo Nif, indicando que, aparentemente nenhum dos aminoácidos trocados leva ao escape do controle da proteína GlnK. A proteína NifA N-truncada expressa a partir do plasmídeo pRAMM2, novamente foi incapaz de produzir fenótipo Nif⁺ (assim como observado na estirpe mutante SmR54) e esta ausência de atividade pode ser atribuída a sua instabilidade.

FIGURA 27 - EFEITO DAS PROTEÍNAS NifA SELVAGEM, N-TRUNCADAS E MUTANTES EXPRESSAS A PARTIR DO PROMOTOR *lac* NA COMPLEMENTAÇÃO DE *H. seropedicae* LNGlnKDel (Nif⁻)



Atividade de nitrogenase das estirpes SmR1 (selvagem) e LNGlnKDel (mutante *glnK*) complementado com os plasmídeos da série pLAC (variantes NifA), com o plasmídeo pRAMM1(NifA selvagem) e com os plasmídeos pRAMM2 e pNifACCT (NifA N-truncada). As médias obtidas resultam de cinco experimentos independentes. As células foram crescidas em meio NFbHP malato semi-sólido suplementado com 0,4 mmol/L de glutamato ou 20 mmol/L de NH₄Cl. O ensaio foi realizado após crescimento por um período de 20 a 30 horas a 30°C.

4.6.2.5 Capacidade de ativação transcricional das proteínas NifA mutantes em *H. seropedicae*

As proteínas NifA mutantes foram ensaiadas em *H. seropedicae* para verificar a capacidade de ativador transcricional destas proteínas na presença e ausência de amônio. Para isso quantificou-se a expressão dos genes *nif* (monitorando por atividade de β -galactosidase) mediada pelas proteínas NifA selvagem e mutantes.

Os plasmídeos da série pLAC foram introduzidos na estirpe repórter de *H. seropedicae* IM40 que caracteriza-se por possuir uma fusão cromossomal *nifH::lacZ* e o gene *nifA* íntegro. Portanto, em condições de fixação de nitrogênio se detecta atividade de β -galactosidase (“background”) uma vez que a proteína NifA da estirpe IM40 está ativa (tabela 8). Esta atividade é mínima em altas concentrações de NH_4^+ . Para realização dos ensaios de β -galactosidase os transconjugantes foram cultivados em NFb-malato em baixa concentração de nitrogênio (5 mmol/L de glutamato) ou em alta concentração (20 mmol/L de NH_4Cl). Os ensaios foram realizados em microaerofilia (1,5% de O_2) (3.19.1.2).

Os resultados estão apresentados na tabela 11 e é possível verificar que, além da proteína NifA selvagem (pRAMM1), as proteínas NifA-Y18F, NifA-I96V e NifA-triplo mutante (pLAC-cis3) mediaram a expressão do gene *nifH* em condição de desrepressão. No entanto, nenhuma expressão de *nifH* foi detectada quando o ensaio foi realizado na presença de amônio (20 mmol/L) tanto para as proteínas NifA selvagem (pRAMM1) e NifA da estirpe IM40 (*nifA*⁺) quanto para as proteínas NifA mutantes, indicando que as mutações não foram suficientes para tornar NifA insensível ao amônio. Como a proteína NifA N-truncada é capaz de ativar a transcrição da fusão *nifH::lacZ* em *E. coli*, independente da presença de amônio, duas proteínas NifA N-truncadas foram utilizadas neste ensaio (pRAMM2 e pLAFR3.18nifACT), porém, em altas concentrações de amônio, nenhuma apresentou atividade. No caso do plasmídeo pLAFR3.18nifACT, *nifA* é expresso a partir do próprio promotor que é regulado pelos níveis de amônio. Por isso, a atividade desta proteína não foi verificada nestas condições, apenas em baixas concentrações de nitrogênio. Enquanto que pRAMM2, que seria utilizado como controle positivo em condições de alto amônio, igualmente não apresentou atividade

e em condições de desrepressão, verificou-se atividade próxima à apresentada pela estirpe IM40. Isto pode ter ocorrido em virtude da instabilidade da proteína NifA N-truncada em *H. seropedicae*, já discutido anteriormente.

TABELA 11 – DETECÇÃO DA CAPACIDADE DE ATIVAÇÃO TRANSCRICIONAL DAS PROTEÍNAS NIFA MUTAGENIZADAS EM *H. seropedicae* IM40 (*nifH::lacZ*, *nifA*⁺).

Estirpe	Plasmídeo	Condições	
		+NH₄/-O*	-NH₄/-O*
IM40	pRAMM1	14,2 ± 7	1009,9 ± 73,8
IM40	pRAMM2	12,6 ± 5	320,9 ± 28,1
IM40	pLAFR3.18nifACT	13,7 ± 10	613,3 ± 64,1
IM40	pLAC-L14P/Y18F	10,4 ± 3	244,5 ± 33,7
IM40	pLAC-L52Q	13,1 ± 8	299,4 ± 22,4
IM40	pLAC-I96V	18,7 ± 3	1141,5 ± 68,3
IM40	pLAC-R157H	15,3 ± 7	301,4 ± 13,3
IM40	pLAC-4	17,8 ± 6	299,9 ± 10,1
IM40	pLAC-cisY18F	15,6 ± 9	391,1 ± 15,7
IM40	pLAC-cisL52Q	14,4 ± 4	276,4 ± 18,8
IM40	pLAC-cis3	13,2 ± 8	528,8 ± 27,7
IM40	Sem plasmídeo	18,8 ± 7	285,4 ± 31,2

* +NH₄ (20 mmol/L de NH₄Cl), -NH₄ (5 mmol/L de glutamato) e - O₂ (1,5%)

A capacidade de ativação transcricional das proteínas NifA mutadas em foi determinada em *H. seropedicae* estirpe IM40 através da ativação da expressão da fusão cromossomal *nifH::lacZ* e medida da atividade de β-galactosidade (dado em unidades Miller). Os ensaios foram realizados como descrito em material e métodos (3.19.1.2). Os valores correspondem à média de 3 experimentos diferentes.

Em condições de fixação de nitrogênio (5 mmol/L de glutamato), diferentes graus de expressão da fusão *nifH::lacZ* foram obtidas conforme a NifA mutante testada. Nestas condições apenas o mutante NifA-I96V (pLAC-I96V) apresentou atividade de β-galactosidase similar à apresentada pela proteína NifA selvagem. O triplo mutante NifA-I96V, E134V, V138E (pLAC-cis3) e NifA-Y18F (pLAC-cisY18F) mostraram até cerca de 50% da atividade de NifA selvagem. Para as proteínas

mutantes NifA-L14P/Y18F (pLAC-L14P/Y18F), NifA-L52Q (pLAC-cisL52Q e pLAC-L52Q), NifA-R157H (pLAC-R157H), NifA-I96V,E134V,V138E, R157H (pLAC-4) e NifA N-truncada (pRAMM2) a atividade observada é semelhante a da estirpe IM40 (resultado considerado como “background”), sugerindo atividade baixa ou ausente para estas proteínas. Como esperado, foi possível verificar expressão da fusão *nifH::lacZ* apenas em microaerofilia, devido a sensibilidade da proteína NifA ao oxigênio.

4.7 ANÁLISE DAS TROCAS DE RESÍDUOS EFETUADAS NO DOMÍNIO N-TERMINAL DE NIFA DE *H. seropedicae*

4.7.1 Análise da região da proteína NifA onde foram efetuadas as trocas de aminoácidos.

Para verificar se as regiões onde foram efetuadas as trocas de resíduos de aminoácido na proteína NifA de *H. seropedicae* são regiões conservadas, foi realizado um alinhamento da região correspondente ao domínio N-terminal das proteínas NifA de organismos pertencentes a diferentes subgrupos: *H. seropedicae* (β -Proteobacteria), *A. brasilense*, *R. capsulatus*, *A. caulinodans* (α -Proteobacteria), *A. vinelandii* e *K. pneumoniae* (γ -Proteobacteria). A figura 28 mostra o alinhamento realizado e confirma o baixo grau de conservação (apenas 4% são aminoácidos conservados) entre as seqüências de aminoácidos dos domínios N-terminais. Quando são comparados domínios N-terminais das proteínas NifA de microrganismos da classe α e β -Proteobacteria esta conservação aumenta para quase 15%. Isto pode acontecer em virtude da presença da proteína regulatória NifL nas γ -Proteobacteria, que sente os níveis de nitrogênio celular, enquanto que as α e β Proteobacteria é o domínio N-terminal da NifA que parece estar envolvido com esta regulação. O maior grau de conservação pode ser devido também a maior proximidade evolutiva entre os grupos, pois quanto menos a distância evolutiva, maior a conservação.

De acordo com o alinhamento, pode se observar que os aminoácidos leucina na posição 14, tirosina na posição 18 e leucina na posição 52, apresentam baixo grau de conservação quando comparados com aqueles aminoácidos da mesma região em outros microorganismos. Para a isoleucina na posição 96, não foi observada a presença deste aminoácido em nenhum dos microorganismos comparados indicando que a troca foi realizada em uma região altamente variável. Porém, o resíduo de arginina na posição 157 apresenta-se conservado nos microorganismos comparados, inclusive em γ Proteobacteria indicando que, por ser uma região conservada, esta região onde foi realizada a mutação pode ser importante para atividade de NifA.

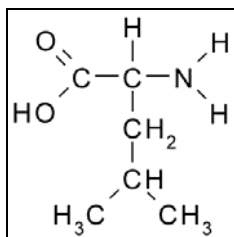
4.7.2 Análise da estrutura dos aminoácidos trocados e da estrutura secundária da proteína NifA de *H. seropedicae*

As trocas de aminoácidos efetuadas no domínio N-terminal das proteínas NifA foram realizadas com base em estudos anteriores, onde proteínas NifA contendo as mutações sítio-dirigidas ou aleatórias com estas trocas já haviam demonstrado provável escape do controle por amônio.

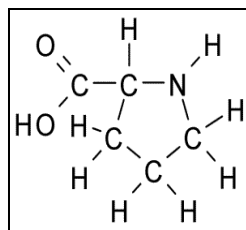
É possível que, para as variantes NifA deste trabalho que apresentaram pouca ou nenhuma atividade nos ensaios realizados, a mudança de aminoácidos leve a uma modificação química que poderia causar alterações nas forças intramoleculares da proteína e assim levar a perda parcial ou total da atividade da proteína. A figura 29 mostra as estruturas e diferenças entre os aminoácidos modificados.

**FIGURA 29 - ESTRUTURA DOS AMINOÁCIDOS TROCADOS NO DOMÍNIO
N-TERMINAL DE NIFA DE *H. seropedicae***

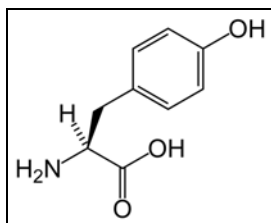
(L14→P) Leucina



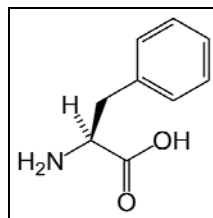
Prolina



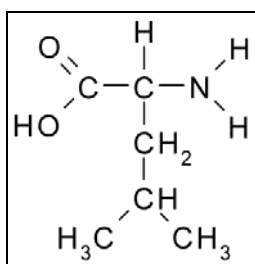
(Y18→F) Tirosina



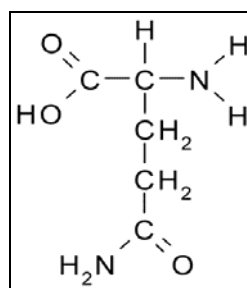
Fenilalanina



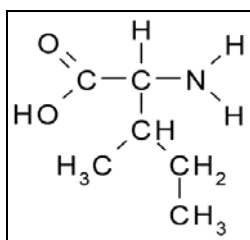
(L52→Q) Leucina



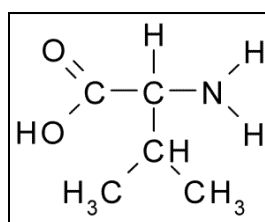
Glutamina



(I96→V) Isoleucina

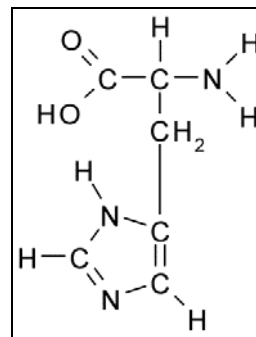
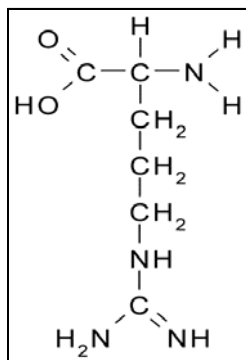


Valina



(R157→H) Arginina

Histidina



A figura mostra uma representação da estrutura dos aminoácidos modificados neste trabalho.

A) Leucina e prolina: aminoácidos apolares; B) Tirosina e fenilalanina: aminoácidos aromáticos; C) Leucina: aminoácido apolar, glutamina: aminoácido polar não carregado; D) Isoleucina e valina: aminoácidos apolares; E) Arginina e histidina: aminoácidos polares carregados positivamente.

Para verificar se as trocas realizadas poderiam de alguma forma modificar a estrutura da proteína NifA e assim afetar sua atividade, foi utilizado o programa PSIPRED (JONES, 1999), pelo qual foi possível fazer uma predição da estrutura secundária das proteínas NifA selvagem (Anexo 1) e mutagenizadas (Anexos 2 a 8).

A mudança mais drástica observada foi a substituição da leucina na posição 14 pelo resíduo de prolina. Apesar de ambos serem aminoácidos com grupo R não-polar e alifático, a leucina é importante nas interações hidrofóbicas que estabilizam estruturas de proteínas, enquanto que, a prolina apresenta uma estrutura em anel, formada pela ligação do último carbono da cadeia lateral com o nitrogênio do grupamento amina, o que impede a rotação ao redor da ligação N-C α , além da formação de pontes de hidrogênio com aminoácidos adjacentes. Por comprometer a estabilidade da α -hélice, a prolina é raramente encontrada nestas regiões (BRANDEN & TOOZE, 1991). No mutante NifA-L14P/Y18F a substituição por prolina ocorreu em uma região de alfa hélice e por isso pode se verificar uma importante modificação na estrutura secundária (Anexo 2) de NifA, o que

provavelmente afetaria também a estrutura terciária desta proteína. A substituição do resíduo de leucina pela prolina, pode ter resultado na redução da flexibilidade estrutural neste ponto da cadeia protéica e conseqüentemente, alteração da conformação e atividade de NifA.

Alterações na estrutura secundária de NifA também são observadas para os mutantes NifA-Y18F (Anexo 3), NifA-L52Q (Anexo 4) e NifA-R157H (Anexo 6), NifA-I96V,E134V,V138E (Anexo 7), NifA-I96V,E134V,V138E, R157H (Anexo 8). No mutante com a troca Y18F, os aminoácidos tirosina e fenilalanina pertencem ao mesmo grupo (grupo R aromático e apolar) e são importantes resíduos para manutenção da estabilidade protéica, uma vez que participam de interações hidrofóbicas. O grupo hidroxila, presente no resíduo de tirosina, pode ainda formar pontes de hidrogênio também importantes na estabilização. Esta substituição levou a diminuição da atividade de NifA. No mutante NifA-L52Q, inativo em todas as condições testadas, a troca ocorre entre dois resíduos de aminoácidos pertencentes a grupos opostos. Enquanto a leucina possui uma volumosa cadeia hidrofóbica, a glutamina é um aminoácido polar, com características mais hidrofílicas. De acordo com a predição secundária, a troca L52→Q provoca alterações em algumas regiões da proteína NifA e estas modificações poderiam afetar de alguma forma sua estabilidade, tornando-a inativa. Da mesma forma, a variante NifA-R157H apresentou-se inativa, apesar de arginina e histidina pertencerem ao mesmo grupo de aminoácidos (grupo R polar e carregado positivamente). Neste caso, a histidina contém um grupo imidazol e é necessário observar que o tamanho ou estrutura da cadeia lateral também pode ser um fator de interferência na estabilidade de proteínas.

Com relação as variantes NifA contendo mutações aleatórias, NifA-I96V, E134V e V138E (triplo mutante) apresentou, assim como NifA-Y18F, redução da sua atividade. Enquanto que, NifA-I96V, E134V, V138E e R157H (tetra mutante) esta atividade foi extinta em todos os ensaios realizados. Os comportamentos observados para estes mutantes pode estar ocorrendo por uma ação conjunta dos aminoácidos, que alteram a conformação e desestabilizam a estrutura da proteína NifA, fazendo com que sua atividade diminua ou seja perdida ou também pela troca de um aminoácido necessário para o correto funcionamento protéico. É importante destacar também que, de acordo com a

predição da estrutura secundária, todas as variantes NifA que apresentaram-se inativas neste trabalho, mostraram uma alteração na região entre os resíduos 250 a 270, indicando que esta pode ser uma região importante para atividade de NifA.

Apenas a variante NifA-I96V (Anexo 5) não apresentou alterações na sua estrutura secundária, mostrando-se equivalente a NifA selvagem, inclusive em seu comportamento fisiológico (figura 22, tabela 11). Este comportamento pode ser decorrente do fato de isoleucina e valina serem aminoácidos não polares com características muito semelhantes.

Finalmente, deve-se considerar que as estruturas previstas pelo programa de predição de estruturas secundárias de proteínas PSIPRED podem não representar o real arranjo espacial entre os resíduos de aminoácidos das seqüências analisadas. Somente com a cristalização da proteína NifA selvagem e das variantes será possível avaliar o efeito das mutações na estrutura.

5. DISCUSSÃO

Os genes *nif* em *H. seropedicae* são transcritos a partir de promotores dependentes do fator σ^{54} e requerem um ativador transcricional específico, a proteína NifA. Neste organismo, a atividade de NifA é regulada em resposta aos níveis de oxigênio e nitrogênio fixado. Os domínios central e C-terminal da proteína estão envolvidos na regulação por oxigênio, enquanto que a sensibilidade aos íons amônio está relacionada ao domínio N-terminal e envolve ainda as proteínas PII (em especial GlnK) que parecem interagir com o domínio N-terminal de NifA (SOUZA et al., 1999; MONTEIRO et al., 1999a,b, NOINDORF, 2006).

A deleção da região correspondente ao domínio N-terminal de NifA demonstrou que este domínio não é necessário para sua atividade e que, além disso, a forma N-truncada é ativa na presença ou ausência de amônio e independente da proteína GlnK (MONTEIRO et al., 1999a, NOINDORF, 2006). Quando o domínio N-terminal e NifA N-truncada são co-expressos na presença de amônio, o domínio N-terminal é capaz de inibir a atividade de ativador da transcrição da proteína NifA N-truncada (MONTEIRO et al., 1999b). Estas informações são um indicativo de que a atividade da proteína NifA é controlada por amônio e por PII através de mecanismos que envolvem seu domínio N-terminal.

Os mecanismos de regulação da atividade de NifA e o papel das proteínas PII têm sido estudados utilizando mutagênese no domínio N-terminal dessa proteína. Arsène e colaboradores (1999) demonstraram que em *A. brasilense* (AbNifA) a troca do resíduo de tirosina na posição 18 por fenilalanina produz uma NifA capaz de escapar do controle da proteína GlnB. Posteriormente, Chen e colaboradores (2005) confirmaram estes dados e ainda apresentaram as proteínas mutantes NifA-Y53F e NifA-Y18F/Y53F que também escapavam do controle de PII. Em *R. capsulatus*, tanto a troca do aminoácido leucina por glutamina na posição 66, como a troca da valina por glutamato na posição 42 do domínio N-terminal da NifA, resultaram em mutantes com atividade de NifA tolerante a amônio (PASCHEN et al., 2001).

Recentemente, em um estudo envolvendo mutantes pontuais no domínio N-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae*, Etto (2006) verificou que os domínios mutagenizados Y18F, L52Q e um tetra mutante aleatório (I96V, E134V, V138E, R157H) não bloqueavam a atividade da proteína NifA N-truncada, quando

em presença de amônio. Os resultados de Etto (2006) confirmaram a importância do domínio N-terminal na regulação da atividade de NifA de *H. seropedicae* em resposta ao amônio, o que já havia sido demonstrado em trabalhos anteriores (SOUZA et al., 1999; MONTEIRO et al., 1999a e b). Além disso, reforçaram as evidências de que esta regulação possa estar relacionada a determinados aminoácidos presentes neste domínio, que parecem ser fundamentais para a atividade inibitória do domínio N-terminal sobre a proteína NifA N-truncada. No presente trabalho, foram obtidos os genes que codificam proteínas NifA de *H. seropedicae* íntegras contendo as mutações no domínio N-terminal (tabela 2) e análises fisiológicas foram realizadas em *E. coli*, *H. seropedicae* e *A. brasilense*.

Em *E. coli*, todas as variantes NifA foram expressas a partir dos promotores *T7*, *tac* e *lac*. Porém, quando os ensaios fisiológicos foram realizados, apenas a proteína NifA N-truncada foi capaz de ativar a transcrição de *nifH* ou *nifB* tanto na presença quanto ausência de amônio. A proteína NifA selvagem e as variantes NifA apresentaram-se inativas em todas as condições testadas e isto pode estar acontecendo devido a presença das mutações ou por haver a necessidade de um fator ou sinal para sua atividade. Este resultado já foi obtido anteriormente por Souza e colaboradores (1999) que demonstraram a inatividade da proteína NifA íntegra de *H. seropedicae* em *E. coli*. No entanto, NifA mostrou-se ativa neste organismo quando co-expressa com a proteína GlnB de *A. brasilense*, sugerindo assim que NifA esteja inerte, provavelmente pela necessidade de um fator ausente nessas enterobactérias (MONTEIRO, 2001).

Os resultados das análises fisiológicas mostraram também que, em condições de fixação, em *H. seropedicae* a proteína mutante NifA-I96V foi capaz de restaurar o fenótipo Nif da estirpe SmR54 (mutante *nifA*). Enquanto que, as proteínas NifA-Y18F e NifA-I96V, E134V, V138E (triplo mutante) restauraram apenas parcialmente este fenótipo, uma vez que a atividade de nitrogenase destas variantes foi cerca de 75 e 60% menores que a da proteína NifA selvagem (figura 22). Em *A. brasilense*, as mesmas proteínas mutantes apresentaram-se ativas, porém as atividades observadas foram menores que aquelas obtidas para *H. seropedicae*, provavelmente por se tratar de um sistema heterólogo (figura 23). A hipótese para a baixa atividade verificada para a variante NifA-Y18F seria a de que a troca da tirosina na posição 18 por fenilalanina causaria uma alteração na

estrutura secundária (Anexo 3) que estaria afetando a estabilidade e/ou atividade de NifA. Diferente do observado para *H. seropedicae*, em *A. brasilense* a variante AbNifA-Y18F além de restabelecer o fenótipo Nif é capaz de escapar do controle de PII (ARSÈNE *et al.*, 1999). Quando é realizada a predição da estrutura secundária das proteínas AbNifA selvagem e AbNifA-Y18F não se observa alteração da estrutura (dados não mostrados). Portanto, esta troca que, em NifA de *A. brasilense* indicou o envolvimento do resíduo tirosina 18 no controle por PII, em *H. seropedicae* afetou a atividade da proteína, mas não a regulação por nitrogênio ou PII.

As variantes NifA-L14P/Y18F (duplo mutante), NifA-L52Q, NifA-R157H e NifA-I96V,E134V,V138E, R157H (tetra mutante), apresentaram-se inativas em todas as condições e estirpes testadas, indicando que as trocas realizadas nestas variantes afetaram a funcionalidade de NifA. Sugere-se que na variante NifA-L14P/Y18F, o resíduo de prolina esteja comprometendo uma região de alfa-hélice (Anexo 2) e por conseguinte a estrutura e atividade desta proteína. NifA-L52Q e NifA-R157H podem ter perdido resíduos fundamentais para a correta conformação e atividade de NifA. A arginina na posição 157, mostra-se conservada em todos os organismos comparados (figura 28), inclusive naqueles pertencentes a classe das γ – Proteobacteria. Em microrganismos desta classe o controle da proteína NifA envolve uma interação específica desta proteína com a proteína NifL (ARCONDEGUY, 2001) que, em condições de suficiência de nitrogênio, inibe a atividade de NifA (MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2004). Dados importantes foram obtidos de estudos de mutantes de NifA de *A. vinelandii* (membro da classe das γ -Proteobacteria), que sugeriram que o domínio GAF possa estar envolvido na repressão intramolecular do domínio Central da NifA mediado pela proteína NifL (REYES-RAMIREZ *et al.*, 2002). Apesar de ocorrerem mecanismos de controle diferentes em *H. seropedicae*, evidencia-se uma provável semelhança entre a regulação negativa que NifL exerce sobre NifA através do domínio GAF e a regulação negativa que o domínio N-terminal de *H. seropedicae* exerce sobre o restante da proteína NifA. Uma vez que o domínio N-terminal é pouco conservado em diferentes organismos, a presença do resíduo de arginina conservado em microrganismos que apresentam mecanismos de controle diferentes de *H. seropedicae*, sugere que este aminoácido pode ser importante para a atividade de NifA. A importância deste resíduo na posição 157 é reforçada pelos resultados de

análise fisiológica do triplo mutante (I96V, E134V, V138E), que não contém esta troca (R157H), mas contém outras três substituições presentes no tetra mutante e apresenta uma baixa atividade, enquanto que o tetra mutante apresenta-se inativo.

Ainda de acordo com os resultados fisiológicos realizados em *H. seropedicae*, não foi observado escape do controle de amônio e nem da proteína GlnK em nenhuma das variantes de NifA que mostraram atividade (NifA-Y18F, NifA-I96V e NifA-triplo mutante) analisadas neste trabalho, indicando que os aminoácidos trocados não estariam envolvidos com a sensibilidade ao amônio ou com uma interação direta com a proteína GlnK. Devido as dificuldades de detecção de NifA em *H. seropedicae*, não foi possível verificar expressão das variantes NifA neste organismo.

Com relação a proteína NifA N-truncada, apesar de complementar o fenótipo Nif da estirpe FP10 de *A. brasilense*, quando expressa a partir do promotor *lac* em *H. seropedicae*, é incapaz de complementar a estirpe mutante *nifA* SmR54 e esta ausência de atividade, já observada por Souza e colaboradores (1999), pode estar acontecendo devido a fatores como: (i) a expressão insuficiente a partir do promotor *lac*, visto que a proteína N-truncada expressa a partir do promotor próprio tem atividade apenas 6% menor que a NifA selvagem (SmR1), (ii) instabilidade desta proteína N-truncada em *H. seropedicae* que, em parte, pode estar ocorrendo devido a presença da cauda de histidinas, iii) ou inatividade desta proteína em seu próprio “background”.

Em seu trabalho, Etto (2006) realizou trocas em aminoácidos que deram o indicativo de serem importantes para a funcionalidade de NifA, mesmo na presença de amônio. Quando o domínio N-terminal, contendo a substituição L52Q ou as quatro mutações aleatórias (tetra mutante), foi co-expresso com a proteína NifA N-truncada, o bloqueio, que naturalmente o domínio N-terminal exerce sobre o restante da proteína em altas concentrações de nitrogênio, deixou de existir, sugerindo que estas mutações levariam ao escape do controle que o amônio exerce sobre NifA. Para o domínio N-terminal que continha a substituição Y18F este escape foi apenas parcial. No atual trabalho, as mesmas mutações foram obtidas e um resultado fisiológico interessante foi observado para estes mutantes. As mutações L52Q e o tetra mutante, as quais fizeram com que NifA escapasse do controle por amônio no trabalho anterior, neste levaram a inatividade de NifA.

Curiosamente, a mutação Y18F que leva a uma escape parcial, neste trabalho mostra também uma NifA parcialmente ativa. Portanto, sugere-se que os mutantes que NifA-L14P/Y18F (duplo mutante), NifA-L52Q, NifA-R157H e NifA- I96V, E134V, V138E, R157H (tetra mutante), para os quais não foram detectadas atividades, assim como para NifA-Y18F onde atividade parcial foi observada, este efeito poderia decorrer em virtude da troca de resíduos fundamentais para atividade de NifA. Pode-se supor que estes resíduos levariam a uma mudança conformacional no domínio N-terminal, que causaria uma modificação da sua estrutura. Quando co-expresso separadamente dos domínios Central+C-terminal, o domínio N-terminal mutagenizado estaria inativo e, desta forma não interagiria com os outros domínios de NifA, observando-se então a proteína NifA N-truncada ativa (ainda que parcialmente, como no caso da troca Y18F) mesmo na presença de amônio (ETTO, 2006). Entretanto, no atual trabalho, as trocas de aminoácidos foram introduzidas na proteína NifA íntegra e portanto, se a mutação interfere na conformação ideal do domínio N-terminal, poderia levar a uma desorganização estrutural da proteína, deixando-a mais susceptível a degradação em *H. seropedicae*. Isso poderia justificar a ausência de atividade ou atividade parcial observada para os mutantes acima citados.

Além disso, estas trocas também poderiam levar a falhas no reconhecimento de NifA por GlnK ou na correta interação funcional entre NifA e GlnK, fazendo com que NifA fique em um estado permanentemente inibido, sugerindo a importância destes aminoácidos na interação NifA-GlnK em *H. seropedicae*. Pode-se supor ainda que, as trocas dos resíduos de aminoácidos efetuada(s) no domínio N-terminal levaria(m) a uma interação permanente proteína-proteína entre o domínio N-terminal e os domínios Central+C-terminal, fazendo com que NifA fique constantemente inativa, mesmo em condições de fixação.

Finalmente, percebe-se que uma complexidade muito grande envolve o correto controle de NifA bem como a participação de seu domínio N-terminal na regulação mediada por PII e amônio. Para uma melhor compreensão dos mecanismos regulatórios, são necessários mais estudos fisiológicos e estruturais com as variantes NifA obtidas neste trabalho.

6. CONCLUSÕES

- Neste trabalho foram produzidas as variantes da proteína NifA de *H. seropedicae* contendo mutações sítio-dirigidas e aleatórias no domínio N-terminal;
- Análises fisiológicas demonstraram que:
 - 1) A troca do aminoácido isoleucina por valina na posição 96 (NifA-I96V) mantém a atividade da proteína NifA de *H. seropedicae*;
 - 2) As variantes NifA-Y18F e NifA-Triplomutante (I96V, E134V, V138E) são parcialmente ativas;
 - 3) As variantes NifA-L14P/Y18F, NifA-L52Q, NifA-R157H e NifA-tetra mutante apresentaram-se inativas, indicando a importância dos resíduos de aminoácidos trocados para a atividade da proteína NifA.
 - 4) Nenhuma das variantes NifA produzidas neste trabalho, que tiveram atividade total ou parcial, escapa do controle da proteína tipo PII – GlnK e nem do controle por amônio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

AMANN, E.; BROSIUS, J.; PTASHNE, M. Vectors bearing a hybrid *trp-lac* promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*. **Gene**. v. 25, p. 167-178, 1983.

ARAÚJO, L.M., MONTEIRO, R.A., SOUZA, E.M., STEFFENS, M. B. R., RIGO, L. U., PEDROSA, F. O., CHUBATSU, L. S. GlnB is specifically required for *Azospirillum brasilense* NifA activity in *Escheria coli*. **Res. Microbiol.** V.155(6), p. 491-5, 2004.

ARCONDEGUY, T., JACK, R., MERRICK, M. P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 65, n.1, p. 80-105, 2001.

ARSENE, F.; KAMINSKI, A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. **J. Bacteriol.**, v.178, p. 4830-4838, 1996.

ARSENE, F.; KAMINSKI, A.; ELMERICH, C. Control of *Azospirillum brasilense* NifA activity by PII: effect of replacing Tyr residues of the NifA N-terminal domain on NifA activity. **FEMS Microbiol. Lett.** V. 179, p. 339-343, 1999.

ATKINSON, M. R.; KAMBEROV, E. S.; WEISS, R. L.; NINFA, A. J. Reversible Uridylylation of the *Escherichia coli* PII Signal Transduction Protein Regulates Its Ability to Stimulate the Dephosphorylation of the Transcription Factor Nitrogen Regulator I (NRI or NtrC). **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 28288-28293, 1994.

ATKINSON, R.; NINFA, A. J. Role of the GlnK signal transduction protein in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 29, p. 431-447, 1998.

ATKINSON, R.; NINFA, A. J: Characterization of the GlnK protein of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** v. 31, p. 301-313, 1999.

BACKMAN, K.; CHEN, Y.M.; MAGASANIK, B. Physical and genetic characterization of the *glnA-glnG* region of the *Escherichia coli* chromosome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78, p. 3743-3747, 1981.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v. 36, p. 86-93, 1986.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.; DOBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, v.13, p. 65-73, 1991.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biol. Biochem.** v.29, n.5/6, p. 911-922, 1997.

BANDULZKI, R.S.; SCHULZE, A. Concentration of indole-3-acetic acid and its derivatives in plants. **Plant Physiol.** v.60, p. 211-213, 1977.

BARRETT, J., RAY, P., SOBCZYK, A., LITTLE, R. DIXON, R. Concerted inhibition of the transcriptional activation functions of the enhancer binding protein NifA by the anti-activator NifL. **Mol. Microbiol.** v. 39, p. 480-493, 2001.

BARRIOS, H., VALDERRAMA, B., and MORETT, E.. Compilation and analysis of sigma(54)-dependent promoter sequences. **Nucleic Acids Res.** v. 27, p. 4305-4313, 1999.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances. **Can. J. Microbiol.** v. 43, p. 103-121, 1997.

BÁSTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically defined culture media. **Plant Growth Regul.** v. 24, p. 7-11, 1998.

BENELLI, E. M.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Evidences for two possible *glnB*-type genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 179, p. 4623-4626, 1997.

BENELLI, E. M.; BUCK, M.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. Uridylation of the PII protein from *Herbaspirillum seropedicae*. **Can. J. Microbiol.** v. 47, p. 309-314, 2001.

BENELLI, E. M.; MONTEIRO, R. A.; NOINDORF, L.; SOUZA, E. M. S.; CHUBATSU, L. S.; PEDROSA, F. O.; BUCK, M. PII and GlnK proteins interact *in vitro* with the N-terminal domain of the NifA protein from *Herbaspirillum seropedicae*. In: XXXI Reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2002, Caxambu. **Programa e Resumos da XXXI Reunião Anual.** p. 236, 2002b.

BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; REIS, V. DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. **Plant and soil.** v 137, n. 1, p. 111-117, 1991.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADEN, C.; TOOZE, J. **Introduction to protein structure.** 1 ed., New York: Garland Publishing, 1991.

BROWN, M. S.; SEGAL, A.; STADTMAN, E. R. Modulation of glutamine synthetase adenylation and deadenylation is mediated by metabolic transformation of the PII-regulatory protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 68, p. 2949-2953, 1971.

BURNETTE, W. N. "Western blotting" : Electrophoretic transfer of protein from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Anal. Biochem.**, v. 112, p. 195 – 203, 1981.

BUCK, M. CANNON, W. Activator-independent formation of a closed complex between σ^{54} -holoenzyme and *nifH* and *nifU* promoters of *Klebsiella pneumoniae*. **Mol. Microbiol.** v.6, n. 12, p. 1625-1630, 1992.

CANNON, F. C.; DIXON, R. A.; POSTAGATE, J. R. Derivation and properties of F-prime factors in *Escherichia coli* nitrogen fixation genes from *Klebsiella pneumoniae*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 93, p. 11-25, 1976.

CHEN S., LIU L., ZHOU X., ELMERICH C., LI J.L. Functional analysis of the GAF domain of NifA in *Azospirillum brasilense*: effects of Tyr-->Phe mutations on NifA and its interaction with GlnB. **Mol Gen. Genomics**. V. 273, p. 415-422, 2005.

CONROY, M.J. DURAND, A.; LUPO, D.; LI, X.D.; BULLOUGH, P.A.; WINKLER, F. The crystal structure of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals how GlnK regulates the ammonia channel. **PNAS**. v. 104, n. 4, p. 1213-1218, 2007.

CROZIER, A.; ARRUDA, P.; ASMIM, J.M.; MONTEIRO, A.M.; SANDBERG, G. Analysis of Indole-3-Acetic Acid and Related Indoles in Culture Medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Appl. Environ. Microbiol.** v.54, n. 11, p. 2833-2837, 1988.

DIXON, R. & KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Rev. /Microbiology**. v. 2, p. 621-631, 2004.

DOBBELAERE S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Crit. Rev. in Plant Scien.**, Amsterdam, v 22, n 2, p 107-149, 2003.

DOBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non leguminous plants. **Symbiosis**, Rehovot, v. 13, p. 1-13, 1992b.

DREPPER, T., GROß, S., YAKUNIN, A. F., HALLENBECK, P. C., MASEPOHL, B., KLIPP, W. Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase system in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **Microbiology**. V. 149, p. 2203-2212, 2003.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Disponível em:

<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2005/marco/noticia.2005-03-07.9754551895/?searchterm=Herbaspirillum>. Acesso em: 12 de janeiro 2007.

ETTO, Mazer Rafael. **Análise mutagênica do domínio regulatório N-terminal da proteína NifA de *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 2006. Tese (Mestrado em Ciências-Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

FISCHER, H. M. Genetic regulation of nitrogen fixation in *Rhizobia*. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 58, p. 352-375, 1994.

GOVANTES, F.; MOLINA-LOPÉZ, J.A.; SANTERO, E. Mechanism of coordinated synthesis of the antagonistic regulatory proteins NifL and NifA of *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.** v. 178, n. 23, p. 6817-6823, 1996

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crops. Research.** V. 65, p. 93-106, 2000.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp.** Ser. 41:95-98, 1999.

HALBLEIB, C. M. ZHANG, Y. & LUDDER, O.W. Regulation of dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase by a redox-dependent conformational change of nitrogenase Fe protein. **J. Biol.Chem.** 275, p3493-3500, 2000.

HE, L.; SOUPENE, E.; NINFA, A.;KUSTU, S. Physiological role for the GlnK protein of enteric bacteria: relief of NifL inhibition under nitrogen-limiting conditions. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 180, p6661-6667, 1998.

HILL, S.; AUSTIN, S.; EYDMANN, T.; JONES, T.; DIXON, R. *Azotobacter vinelandii* NifL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen fixation genes via redox-sensitive switch. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** V. 93, p. 2143-2148, 1996.

HO Y. S., BURDEN L.M., HURLEY J.H. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. **EMBO J.** p.5288-99, 2000.

HOWARD, B. J.; REES, D. C. Structural basis of biological nitrogen fixation. **Chem. Rev.**, v. 96, p. 2965-2982, 1996.

HUALA. E.; AUSUBEL, F. The central domain of *Rhizobium meliloti* NifA is sufficient to activate transcription from the *R. meliloti nifH* promoter.**J. Bacteriol.** v. 171, n6, p. 3354-3365, 1989.

HUERGO, Luciano Fernandes. **Regulação do metabolismo do nitrogênio em *Azospirillum brasilense***. Curitiba, 2006. Tese (doutorado em Ciências-Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

JACK, R.; de ZAMAROCZY, M.; MERRICK, M. The signal transduction protein GlnK is required for NifL-dependent nitrogen control of *nif* gene expression in *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 181(4), p. 1156-1162, 1999.

JAVELLE, A.; SEVERI, E.; THORNTON, J.; MERRICK, M. Ammonium sensing in *E. coli*: The role of the ammonium transporter AmtB and AmtB-GlnK complex formation. **J. Biol. Chem.** v. 279, p. 8530-8538, 2004.

JAVELLE, A.; MERRICK, M. Complex formation between AmtB and GlnK: an ancestral role in prokaryotic nitrogen control. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 33, p. 170-172, 2005.

JIANG, P. NINFA, A.J. Regulation of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II by the PII signal transduction protein. **J. Bacteriol.** p. 1906-1911, 1999.

JONES, D.T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. **J. Mol. Biol.** v. 292, p. 195-202, 1999.

KIM, J.; REES, D.C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochem.**, New York, v. 33, p. 389-397, 1994.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 43, p. 887-891, 1997.

KLEINER, D. Bacterial ammonium transport. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 32, p. 87-100, 1985.

KLEINER, D.; PAUL, W.; MERRICK, M. J. Construction of multicopy expression vectors for regulated over-production of proteins in *Klebsiella pneumoniae* and other enteric bacteria. **J. Gen. Microbiol.**, v. 134, p. 779-1784, 1988.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. **Nature**, (Lond.), v. 277, p. 680-685, 1970.

LEIGH, J.A., DODSWORTH, J.A. Nitrogen regulation in Bacteria and Archea. **Annu. Rev. Microbiol.** v.61, p. 349-377, 2007.

LIANG, Y.Y.; KAMINSKI, P.A.; ELMERICH, C. Identification of a *nifA-like* regulatory gene of *Azospirillum brasilense* S17 expressed under conditions of nitrogen fixation and in the presence of air and ammonia. **Mol. Microbiol.** v.5, p 2735-2744, 1991.

LIN-GOERKE J.L., ROBBINS D.J., BURCZAK J.D. PCR-based random mutagenesis using manganese and reduced dNTP concentration. **Biotechniques**, V.23, n.3, p. 409-412, 1997.

LITTLE, R.; COLOMBO, V.; LEECH, A.; DIXON, R. Direct interaction of NifL regulatory protein with the GlnK signal transducer enables the *Azotobacter vinelandii* NifL-NifA regulatory system to respond to conditions replete for nitrogen. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p.15472-15481, 2002.

LITTLE, R & DIXON, R. The amino-terminal GAF domain of *Azotobacter vinelandii*

NifA binds 2-oxoglutarate to resist inhibition by NifL under nitrogen-limiting conditions. **J. Biol. Chem.** V.278, p. 28711-28718, 2003.

LITTLE, R.; MARTINEZ-ARGUDO, I.; DIXON, R. Role of the central region of NifL in conformational switches that regulate nitrogen fixation. **Biochem. Soc. Trans.** v.34, p.162-164, 2006.

LUDEWIG, U.; NEUHÄUSER, B.; DYNOWSKI, M. Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants. **FEBS.** v. 581, p. 2301-2308, 2007.

MACHADO, H. B., YATES, M. G., FUNAYAMA, S., RIGO, L. U., STEFFENS, M. B. R., SOUZA, E. M., PEDROSA, F. O. The *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* are part of a *nifR3*-like-*ntrB*-*ntrC* operon and are negatively regulated. **Can J Microbiol.** v. 41, 674-684, Ago 1995.

MACHADO, I.M.P.; YATES, M.G.; MACHADO, H. B.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Cloning and sequencing of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 29, n.12, p.1599-1602, 1996.

MARINI, A. M.; VISSERS, S.; URRESTARAZU, A.; ANDRE, B. Cloning and expression of the MEP1 gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J.**, v. 13, p. 3456-3463, 1994.

MARINI, A. M.; SOUSSI-BOUDEKOU, S.; VISSERS, S.; ANDRE, B. A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell Biol.**, v. 17, p. 4282-4293, 1997.

MARTINEZ-ARGUDO I, LITTLE R, DIXON R. Role of the amino-terminal GAF domain of the NifA activator in controlling the response to the antiactivator protein NifL. **Mol. Microbiol.** V. 56, p.1731-1744, 2004a.

MARTINEZ-ARGUDO I., LITTLE R., SHEARER N., JOHNSON, P., DIXON R. The NifL-NifA system: a multidomain transcriptional regulatory complex that integrates environmental signals. **J. Bacteriol.** p.601-610, 2004b.

MASEPOHL, B., KLIPP, W., PÜHLER, A. Genetic characterization and sequence analysis of the duplicated *nifA/nifB* gene region of *Rhodobacter capsulatus*. **Mol. Gen. Genet.** v. 212, p. 27-37, 1988.

MERRICK, M. Regulation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic bacteria. **Biological Nitrogen Fixation.** 1 ed., New York: Chapman & Hall, 1992.

MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A.. Nitrogen control in bacteria. **Microbiol. Rev.** v. 59, p. 604-622, 1995.

MERRICK, M.J. Regulation of nitrogen fixation in free-living diazotrophs. *In*: KLIPP, W.; MASEPOHL, B.; GALLON, J.R.; NEWTON, W.E. **Genetic Regulation of Nitrogen Fixation in Free-living Bacteria.** Inc Net Library, 2004.

MICHEL-REYDELLET, N.; KAMINSKI, P.A. *Azorhizobium caulinodans* PII and GlnK proteins control nitrogen fixation and ammonia assimilation. *J. Bacteriol.* v.181, p. 2655-2658, 1999.

MILLER, J. H. **A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria.** Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992.

MONEY, T.; JONES, T.; DIXON, R.; AUSTIN, S. Isolation and properties of the complex between the enhancer binding protein NifA and the sensor NifL. *J. Bacteriol.*, v. 181, p. 4461-4468, 1999.

MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Expression and functional analysis of a N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS Lett.** V. 447, p. 283-286, 1999a.

MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. In-trans regulation of the N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae* by the N-terminal domain. **FEMS Microbiol. Lett.** V. 180, p. 157-161, 1999b.

MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E. M.; WASSEM, R.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Inter-domain cross-talk controls the NifA protein activity of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS Lett.** V. 508, p. 1-4, 2001a.

MONTEIRO, Rose Adele. **Análise funcional dos domínios modulares da proteína NifA de *Herbaspirillum seropedicae*.** Curitiba, 2001. Tese (doutorado em Ciências-Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; STEFFENS, M.B.R.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Expression, purification, and functional analysis of the C-terminal domain of *Herbaspirillum seropedicae* NifA protein. **Protein Express. Purif.** v. 27, p. 313-318, 2003a.

MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Fnr is involved in oxygen control of *Herbaspirillum seropedicae* N-truncated NifA protein activity in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiol.**, v.69(3), 2003b.

NINFA, E. G.; ATKINSON, M. R.; KAMBEROV, E. S.; NINFA, A. J. Mechanism of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II (NRII or NtrB): trans-phosphorylation between subunits. *J. Bacteriol.*, v. 175, p. 7024-7032, 1993.

NINFA, A.J.; ATKINSON, M.R. PII signal transduction proteins. **Trends Microbiol.** v.8, n.4, p. 172-179, 2000.

NINFA, A. J.; JIANG, P. PII signal transduction proteins: sensors of alpha-ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 8, p. 168-173, 2005.

NINNEMANN, O. ; JAUNIAUX, J.; FROMMER, W. B. Identification of high affinity NH_4^+ transporter from plants. **EMBO J.**, v. 13, p. 3464-3471, 1994.

NOINDORF, L. **Clonagem, sequenciamento e caracterização dos genes *glnK* e *amtB* de *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 2002. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências- Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

NOINDORF, L. **Clonagem, sequenciamento e caracterização dos genes *glnK* e *amtB* de *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 2006. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências- Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

NOINDORF, L., REGO, F. G.M., BAURA, V. A., MONTEIRO, R. A., CRUZ, L. M., RIGO, L. U., SOUZA, E. M., STEFFENS, M. B. R., PEDROSA, F. O., CHUBATSU, L. S. Characterization of the *orf1glnKamtB* operon of *Herbaspirillum seropedicae*. **Arch. Microbiol.** v 185, p 55-62 , 2006.

OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biol. Fertil Soils**. v. 21, p. 197-200, 1996.

PAREKH, B.S.; HATFIELD, G.W. Transcriptional activation by protein-induced DNA bending: evidence for a DNA structural transmission model. **Biochem.** v. 93, p. 1173-1177, 1996.

PASCHEN, A.; DREPPER, T.; MASEPOHL, B.; KLIPP, W. *Rhodobacter capsulatus nifA* mutants mediating *nif* genes expression in the presence of ammonium. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 200, p. 207-213, 2001.

PAWLOWSKI, A.; RIEDEL, K.U.; KLIPP, W.; DREISKEMPER, P.; GRO, S.; BIERHOFF, H.; DREPPER, T.; MASEPOHL, B. Yest-two hybrid studies on interaction of proteins involved in regulation of nitrogen fixation in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **J. Bacteriol.** p.5240-5247, 2003.

PEDROSA, F.O.; YATES, M.G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntrC* type genes. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 23, p. 95-101, 1984.

PEDROSA, F. O.; BENELLI, E. M.; YATES, M. G.; WASSEM, R.; MONTEIRO, R. A.; KLASSEN, G.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M.; CHUBATSU, L. S.; RIGO, L. U. Recent developments in the structural organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Biotechnology**, v. 91, p. 189-195, 2001.

PEOPLES, M.B.; CRASWELL, E.T. Biological nitrogen fixation for a sustainable agriculture: a perspective. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.141, n.1, p.1-11, 1992.

PERSUHN, D.C., SOUZA, E.M., STEFFENS, M.B.R., PEDROSA, F.O.; YATES, M.G., RIGO, L.U. The transcriptional activator NtrC controls the expression and activity of lutaminessynthetase in *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 192, p. 217–221, 2000.

POSTGATE, J.R. Nitrogen Fixation. **Cambridge University Press**. Cambridge **Phil Trans. R. Soc. Lond.**, 3 ed, p.12-22, 1998.

QURESHI, M.; EYDMANN, T.; AUSTIN, S.; DIXON, R. Torsional constraint on the formation of open promoter complexes on DNA minicircles carrying σ^{54} -dependent promoters. **Biochem.** v. 36, p.12303-12316, 1997.

RADWAN, T.E.S.E.D, MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesq. Agrop. Brás.** v. 39, n. 10, p. 987-994, 2004.

REES, DC.; TEZCAN, F.A.; HAYNES, C.A. WALTON, M.Y. ; ANDRADE, S.; EINSLE, O. HOWARD, J.B. Stuctural basis of biological nitrogen fixation. **Phil. Trans. R. Soc.** v. 363, p. 971-984, 2005.

REITZER, L. Nitrogen assimilation and global regulation in *Escheichia coli*. **Ann. Rev. Microbiol.** v. 57, p. 155-176, 2003.

REYES-RAMIREZ F, LITTLE R, DIXON R. Role of *Escherichia coli* nitrogen regulatory genes in the nitrogen response of the *Azotobacter vinelandii* NifL-NifA complex. **J. Bacteriol.** v. 183, n. 10, p. 3076-3082, 2001.

REYES-RAMIREZ F, LITTLE R, DIXON R. Mutant forms of the *Azotobacter vinelandii* transcriptional activator NifA resistant to inhibition by the NifL regulatory protein. **J Bacteriol.** V. 184, p. 6777-6785, 2002.

RONCATO-MACCARI, L.B.D; RAMOS, H.J.O; PEDROSA, F.O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L.S.; Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. **Fems Microbiology Ecology** n.45 (1), pp.39-47,2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2 ed., New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SENIOR, P.J. Regulation of nitrogen metabolism in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*: studies with the continuous culture technique. **J. Bacteriol.**, v. 123, p. 407-410, 1975.

SIMPSON, F.B.; BURRIS, R.H. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. **Science**, v. 224, p. 1095-1096, 1984.

SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Cloning and characterization of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Can. J. Microbiol.** , Ottawa, v. 37, p.425-429, 1991a.

SOUZA, E.M.; FUNAYAMA. S.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F. O. Sequence and strutural organization of a *nifA*- like gene and part of a *nifB*-like gene of

Herbaspirillum seropedicae strain Z78. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v.137, p.1511-1522, 1991b.

SOUZA, E.M.; PEDROSA, F. O.; DRUMMOND, M.; RIGO, L. U.; YATES, M.G. Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity by ammonium ions and oxygen. **J. Bacteriol.**, Washington, vol. 181(2), p. 681-684, 1999.

SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; RIGO, L.U.; MACHADO, H.B.; YATES, M.G. Expression of the *nifA* gene of *Herbaspirillum seropedicae*: role of the NtrC and NifA binding sites of the -24/-12 promoter element. **Microbiology**, v.146, p.1407-1418, 2000.

STIPS J., THUMMER, R., NEUMANN, M., SCHMITZ, A. GlnK effect complex formation between NifA and NifL in *Klebsiella pneumoniae*. **Eur. J. Biochem.** V. 271, p. 3379-3388, 2004.

STUDHOLME D. J., DIXON R. Domain architectures of sigma54-dependent transcriptional activators. **J Bacteriol.** p. 1757-67, 2003

TABOR, S. & RICHARDSON, C.C. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.82, p. 1074-1078, 1985.

THOMAS, G.H.; MULLINS, .G.L.; NERRICK, M. Membrane topology of the Mep/Amt family of ammonium transporters. **Mol. Microbiol.** v 37, n. 2, p. 331-344, 2000.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D ; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F. AND HIGGINS, D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.**, v. 24, p. 4876-4882, 1997

TULI, R.; MERRICK, M. J. Over-production and characterization of the nifA gene product of *Klebsiella pneumoniae* the transcription activator of nif gene expression. **J. Gen. Microbiol.**, v. 134, p. 425-432, 1988.

von WIREN, N.; MERRICK, M. Regulation and function of ammonium carriers in bacteria, fungi and plants. **Topics Curr. Genet.**, v. 9, p. 95-120, 2004.

WASSEM, R.; SOUZA, E.M.; YATES, G.M.; PEDROSA, F.O.; BUCK, M. Two roles for integration host factor at an enhancer-dependent *nifA* promoter. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 35, p. 756-764, 2000.

WASSEM, R.; PEDROSA, F.O.; YATES, G.M.; REGO, F.G.M.; CHUBATSU, L.S.; RIGO, L.U.; SOUZA, E.M. Control of autogenous activation of *Herbaspirillum*

seropedicae nifA promoter by the IHF protein. **FEMS Microbiol.** v. 212, p. 177-182, 2002.

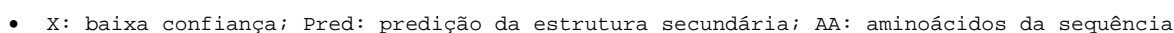
YOUNG, J.P.W. **Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organism.** *In:* Biological Nitrogen Fixation (Stacey, G.; Burris, R.H.; Evans, H.J.). Chapman and Hall, New York. p. 43-86, 1992.

ZHANG, Y., POHLMANN, E.L., LUDDEN, P.W., ROBERTS G.P. Mutagenesis and functional characterization of the *glnB*, *glnA*, and *nifA* genes from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **J. Bacteriol**, v.182, p. 983-992, 2000.

ZHANG, Y.; POHLMANN, E. L.; ROBERTS, G. P. Identification of critical residues in GlnB for its activation of NifA activity in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, p. 2782-2787, 2004.

ZHENG, L.; KOSTREWA, D.; BERNÈCHE, S.; WINCLER, F.K.; LI, X.D. The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*. **PNAS**. v. 101, n.49, p. 17090-17095.

ANEXOS



- α - hélice:

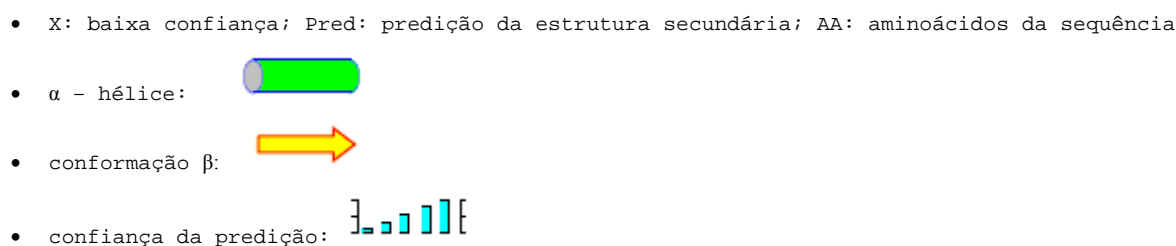


- conformação β :



- confiança da predição:





Anexo 5: Predição da estrutura secundária da proteína NifA-I96V



• X: baixa confiança; Pred: predição da estrutura secundária; AA: aminoácidos da sequência

• α - hélice:

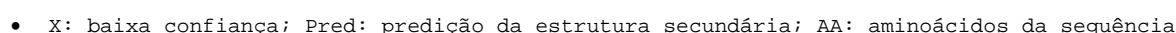


• conformação β :



• confiança da predição:





Anexo 8: Predição da estrutura secundária da proteína NifA- NifA-I96V, E134V, V138E e R157H (tetra mutante)



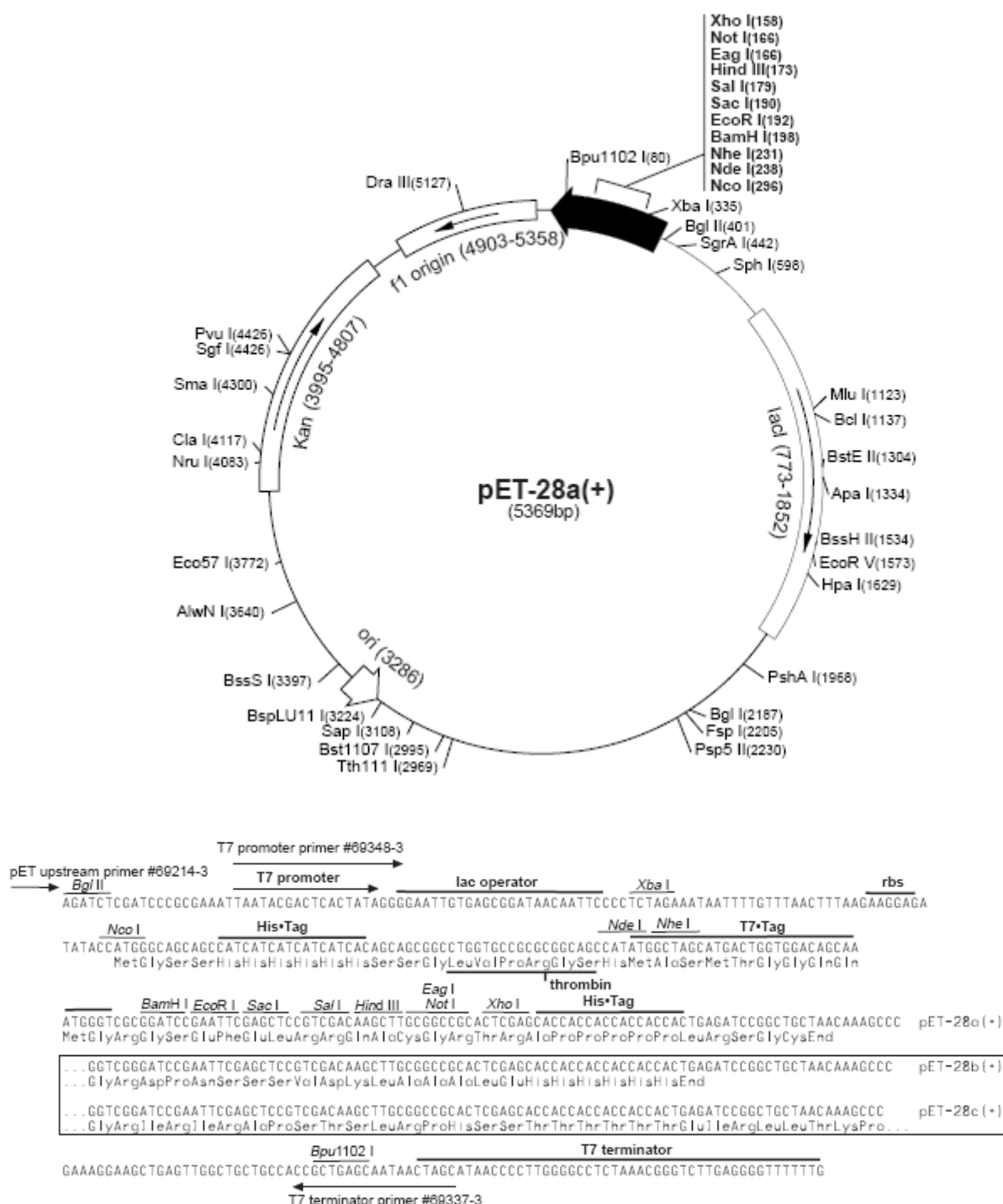
- X: baixa confiança; Pred: predição da estrutura secundária; AA: aminoácidos da sequência

- α - hélice:

- conformação β :

- confiança da predição:

Anexo 9: Vetor pET28a



pET-28a-c(+) cloning/expression region